

Pharmakologie und Spannungsabhängigkeit ausgewählter Prostanoid-Rezeptoren

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michael Kurz

aus Offenbach am Main

Marburg/Lahn 2020

Erstgutachter: **Prof. Dr. Moritz Bünemann**
Zweitgutachter: **Prof. Dr. Jens Kockskämper**

Eingereicht am 12.02.2020
Tag der mündlichen Prüfung am 26.03.2020

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VI</i>
<i>1 Zusammenfassung</i>	<i>1</i>
<i>2 Summary</i>	<i>3</i>
<i>3 Einleitung</i>	<i>5</i>
3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	6
3.1.1 Allgemein	6
3.1.2 Struktur und Aktivierung der GPCRs	8
3.2 Signalweiterleitung und Abschaltung	10
3.2.1 G-Proteine	10
3.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen und Arrestine	12
3.3 Prostanoid Rezeptoren	12
3.3.1 Struktur der Prostanoidrezeptoren und Bindungsmodus	13
3.3.2 Bildung der Prostanoid- und Isoprostanoid- sowie deren Abbau	15
3.3.3 Physiologische Funktionen und arzneilicher Nutzen der Prostanoid-Rezeptoren	17
3.4 Spannungsabhängigkeit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	19
3.4.1 Spannungssensor für GPCRs	23
3.5 Ziel dieser Arbeit	26
<i>4 Material und Methoden</i>	<i>28</i>
4.1 Material	28
4.1.1 Software und Datenbanken	28
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	28
4.1.3 Chemikalien	29
4.1.4 Synthetisierte Halogenbenzulfonamide	30
4.1.5 Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien	31
4.1.6 Plasmide	31
4.1.7 Verwendete Oligos	35
4.1.8 Verwendete Kits	38
4.1.9 Verwendete Geräte	39
4.2 Methoden	40
4.2.1 Zellkultur	40
4.2.2 Molekularbiologische Methoden	44
4.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Methoden	54
4.2.4 Kontrolle des Membranpotentials durch die <i>Patch-Clamp</i> Technik	62
4.2.5 FRET Messungen unter direkter Kontrolle des Membranpotentials	63
4.2.6 Messungen von GIRK Strömen in HEK293T-Zellen	64
4.2.7 Auswertung der Messdaten und Statistik	64
4.2.8 Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder	65
4.2.9 Aufnahme konfokaler, fluoreszenzmikroskopischer Bilder	65

5	<i>Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren</i>	66
5.1	Ergebnisse	66
5.1.1	Untersuchung des TP-Rezeptors auf Spannungsabhängigkeit	66
5.1.2	Die Liganden induzierte Aktivierung des TP-Rezeptors wird durch Depolarisation im physiologischen Bereich des V_M potenziert	69
5.1.3	Der Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor wird auf G-Protein- und Effektor-Ebene weitergeben	70
5.1.4	Spannungseffekt auf die Affinität des TP-Rezeptors	73
5.1.5	Die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors hängt nicht von bestimmten funktionellen Gruppen des Agonisten ab	75
5.1.6	8-iso PGE ₂ : Affinitätszunahme bei Depolarisation	77
5.1.7	Mutationen an R295 ^{7,40} verändern den Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor	78
5.1.8	Spannungsabhängigkeit des Prostaglandin F Rezeptors	83
5.1.9	Keine Spannungsabhängigkeit für IP-Rezeptor detektierbar	84
5.1.10	Spannungsabhängigkeit des EP ₃ -Rezeptors	87
5.1.11	Keine Spannungsabhängigkeit für PAR1 detektierbar	89
5.2	Diskussion	91
5.2.1	Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren	91
6	<i>Daltroban – ein ungewöhnlicher Ligand</i>	100
6.1	Ergebnisse	100
6.1.1	Transiente $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktion bei TP Rezeptor Aktivierung mit Daltroban	100
6.1.2	Transiente TP-Rezeptor Aktivierung durch Daltroban in HeLa Zellen	102
6.1.3	TP Rezeptor aktiviert mit Daltroban führt zu transienter $G\alpha_q$ -Aktivierung, sowie transienter Interaktion von TP-Rezeptor mit $G\alpha_{13}$ und mit GRK2	102
6.1.4	Daltroban führt zu einer transienten Konformationsänderung des TP-Rezeptors	105
6.1.5	Daltroban wandelt sich in hohen Konzentrationen vom Antagonist zum Partialagonisten	107
6.1.6	Keine Auswaschbarkeit der reduzierten Antwort auf U46619 nach Daltroban Gabe	108
6.1.7	Effekt verschiedener Halogenbenzensulfonamide auf die TP-Rezeptor-Aktivität	110
6.1.8	TP-Rezeptor-Mutanten mit Wirkung auf den Daltroban Effekt	113
6.1.9	Effekt von Daltroban und anderer Halogenbenzensulfonamide auf die Aktivität der TP-Rezeptor-Mutante W299 ^{7,44} L	115
6.1.10	Erhöhte intrinsische Aktivität für Ramatroban an der TP-Rezeptor-Mutante F34 ^{1,42} A	119
6.1.11	Pinan Thromboxan A ₂ zeigt keinen, mit Daltroban vergleichbaren, transienten Effekt auf die TP-Rezeptor Aktivität	120
6.2	Diskussion	121
7	<i>Systematische Erstellung FRET-basierter GPCR-Rezeptor-Sensoren</i>	126
7.1	Ergebnisse	126
7.1.1	Klonierung eines IP-Rezeptor-Sensors	126
7.1.2	Begonnene Klonierung eines EP ₃ -Rezeptor-Sensors	128
7.1.3	Klonierung eines FP-Rezeptor-Sensors	128
7.1.4	Klonierung eines ET _B -Rezeptor-Sensors	130
7.2	Diskussion	131

Inhaltsverzeichnis

<i>Literatur</i>	<i>134</i>
<i>Erklärung</i>	<i>143</i>
<i>Publikationen und Konferenzbeiträge</i>	<i>144</i>
Publikationen	144
Publizierte Artikel	144
Publizierte <i>Abstracts</i>	144
Konferenzbeiträge	144
<i>Danksagung</i>	<i>145</i>
<i>Lebenslauf</i>	<i>147</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
α_{2A} AR	α_{2A} -adrenerger Rezeptor
β AR	β -adrenerger Rezeptor
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cer	Cerulean
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
DA	Dopamin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
D2R	Dopaminerger D2 Rezeptor
D3R	Dopaminerger D3 Rezeptor
eYFP	Gelb fluoreszierendes Protein (Enhanced Yellow Fluorescent Protein)
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
EC ₅₀	Halbmaximal effektive Konzentration
E.coli	Escherichia coli
ET _B -Rezeptor	Endothelin B Rezeptor
EP ₃ -Rezeptor	Prostaglandin E ₂ Subtyp 3 Rezeptor
FIAsH	Fluorescein Arsenical Helix Binder
F	Fluoreszenzintensität
Fw	<i>Forward</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FIIa	Thrombin
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
FP-Rezeptor	Prostaglandin F Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK-Kanal	G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter Kaliumkanal
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
ICL	Intrazelluläre Schleife

Abkürzungsverzeichnis

IP-Rezeptor	Prostazyklin Rezeptor
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
M-AChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mTurq	mTurquoise
MW	Mittelwert
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTA ₂	Pinan Thromboxan A ₂
PTX	Pertussis Toxin
RhoGEF	„RhoGTPase Nucleotid Austauschfaktor“
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	Messfeld (<i>Region of interest</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute
Rv	<i>Revers</i>
SEM.	Standardfehler
t _{0,5}	Halbwertszeit
TM	Transmembrandomäne
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TP-Rezeptor	Thromboxan A ₂ Rezeptor
V _{0,5}	Halbmaximal effektives Potential
V _M	Membranpotential
wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
[³ H]	Tritium

1 Zusammenfassung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen die größte Familie transmembranärer Rezeptoren im menschlichen Genom dar. 34% der 2017 von der FDA zugelassenen Wirkstoffe haben einen GPCR als Zielstruktur, weshalb diese Rezeptorgruppe im Fokus der pharmakologischen Forschung steht (Hauser *et al.*, 2017). GPCRs als integrale Membranproteine sind einem starken elektrischen Feld ausgesetzt, das natürlichen Schwankungen unterliegt. Vor mittlerweile über 15 Jahren konnte erstmals für Vertreter dieser Gruppe gezeigt werden, dass die Agonist-induzierte Rezeptoraktivität durch Änderungen des Membranpotentials (V_M) moduliert wurde (Ben-Chaim *et al.*, 2003). Obwohl seitdem bereits einige Zeit vergangen ist und an diesem Thema intensiv geforscht wurde, konnten viele sich aus dieser Entdeckung ergebende Fragen noch nicht oder nur teilweise beantwortet werden. So ist bis heute keine allgemein gültige Erklärung zu dem zugrundeliegenden Mechanismus der Spannungsabhängigkeit von GPCRs beschrieben worden. Mittlerweile wurden unterschiedliche Gruppen von GPCRs auf ihre Spannungsabhängigkeit untersucht. Eine Gruppe mit einer weiten Verbreitung im menschlichen Körper, über die vor dieser Studie noch wenig unter diesem Aspekt bekannt war, ist die Gruppe der Prostanoid-Rezeptoren. Der Startpunkt für diese Studie war eine Untersuchung an Megakaryozyten die eine Aktivierung endogener Thromboxan-Rezeptoren (TP-Rezeptoren) in Anwesenheit eines Agonisten bei Depolarisation nahe legte (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Aufgrund der fehlenden Linearität der angewandten Messung von Calciumspiegeln zur Rezeptor-Aktivität, konnte weder eine qualitative noch eine quantitative Untersuchung des Spannungseffektes erfolgen. Wir verwendeten in dieser Arbeit FRET-Biosensoren, die direkter die TP-Rezeptor-Aktivität wiedergaben und somit eine Charakterisierung des Spannungseffektes ermöglichten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine FRET-basierter TP-Rezeptor-Konformations-Sensor kloniert. Die eigentliche Untersuchung der Spannungsabhängigkeit erfolgte mit einer Kombination aus FRET-Messung als Maß für die Rezeptor-Aktivität und gleichzeitiger *Patch-Clamp* Messung zur Kontrolle der Membranspannung. Hierbei zeigte sich eine robuste Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors sowohl auf Rezeptorebene, als auch auf Ebene der nachgeschalteten Signalübertragung. Die TP-Rezeptor-Aktivität verdoppelte sich bei Depolarisation von -90 mV auf +60 mV in Gegenwart von U46619, einem stabilen Analogon von Prostaglandin H_2 . Der für den TP-Rezeptor ermittelte halbmaximale Spannungseffekt $V_{0,5}$ betrug -46 mV, was innerhalb des physiologischen Bereichs von V_M lag. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Spannungseffekt sich im Wesentlichen auf die Affinität des TP-Rezeptor für U46619 auswirkte. So konnten wir unter anderem beobachten, dass der EC_{50} für U46619 bei -90 mV im Vergleich zu +60 mV ungefähr 4,5-fach links verschoben war und das gleiche Maximum aufwies. Wir haben den Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor, aktiviert mit verschiedenen substituierten Prostanoid-Derivaten, die jeweils Modifikationen an verschiedenen Stellen des Moleküls trugen, getestet. Alle getesteten Liganden zeigten eine Aktivierung bei Depolarisation, was auf eine eher globale Änderung der TP-

Rezeptor-Konformation durch Depolarisation hindeutet. Dazu passen unser Befund, dass keine von uns durchgeführten Mutationen, an Stellen die für die Ligandenbindung des TP-Rezeptors wichtig waren, zu einer Änderung Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors führten. Folglich ergaben sich keine Hinweise auf eine spezifische Modulation der Rezeptor Liganden Interaktion durch Spannungsänderung.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass der Bereich und die Stärke der Spannungsabhängigkeit durch R295^{7,40}, eine Aminosäure, die sich in Agonistenbindetasche befand, eingeschränkt wurde. Die Modulation der Liganden-induzierten Rezeptor-Aktivität durch V_M war nicht auf den TP-Rezeptor beschränkt, da der mit U46619 aktivierte Prostaglandin F-Rezeptor (FP-Rezeptor) und der mit Iloprost aktivierte Prostaglandin E_2 -Rezeptor-Subtyp 3 (EP_3 -Rezeptor) eine ähnliche Reaktion auf die Depolarisation zeigten wie der mit U46619 aktivierte TP-Rezeptor. IP-Rezeptor aktiviert mit Iloprost zeigte hingegen keine nachweisbare Spannungsabhängigkeit. Der Unterschied in der Spannungsabhängigkeit konnte nicht auf einzelne unterschiedlich geladene Aminosäuren zurückgeführt werden, weshalb ein komplexerer Unterschied als Grund für die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit anzunehmen ist. Im Rahmen dieser Studie wurde auch der PAR1 mit dem besonders sensitiven $G\alpha_{13}$ -p115-FRET-Interaktions-Assay untersucht, wobei sich herausstellte, dass der PAR1 aktiviert mit Thrombin keinen Spannungseffekt aufwies.

Auf der Suche nach einer Liganden-spezifischen Spannungsabhängigkeit wurde Daltroban, ein TP-Rezeptor Antagonist, für den es Hinweise auf einen Partialagonismus gab, untersucht. Es zeigte sich zu unserem Erstaunen, dass Daltroban in hohen Konzentrationen vom Antagonisten zum Partialagonisten wurde, der den TP-Rezeptor transient aktivierte. Aufgrund dieses bemerkenswerten Befundes wurde der beobachtete Daltroban Effekt weiter untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der TP-Rezeptor nach Daltroban-Gabe eine reduzierte Aktivierbarkeit aufwies, wobei unklar blieb, ob Daltroban (pseudo-)irreversibel am Rezeptor band. Für den partialagonistischen Effekt spielten Kontakte von Daltroban mit der orthosterischen Bindestelle eine Rolle. Zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von Daltroban, wurden verschiedene Daltroban-Derivate getestet. Der zugrundeliegende Mechanismus blieb unklar und wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit eine systematische Herangehensweise entwickelt, um FRET-basierte GPCR-Rezeptor-Sensoren zu klonieren, da diese für zukünftige direkte Untersuchungen der Qualität und Quantität des Spannungseffektes auf die Liganden-induzierte GPCR-Aktivität von großem Wert sein können. So wurden in dieser Arbeit erfolgreich FRET-basierte GPCR-Rezeptor-Sensoren für IP-Rezeptor, FP-Rezeptor und ET_B -Rezeptor kloniert.

2 Summary

G-protein coupled receptors (GPCRs) comprise the largest family of transmembrane receptors in the human genome. Thirty-four percent of the drugs approved by the FDA in 2017 have a GPCR as their target, which is why this receptor group is in focus of pharmacological research (Hauser *et al.*, 2017). GPCRs as integral membrane proteins are exposed to a strong electrical field that is subject to natural fluctuations. It is now over 15 years ago, that for the first time the agonist-induced receptor activity modulated by changes in membrane potential (V_M) could be shown for a member of this group (Ben-Chaim *et al.*, 2003). Although some time has passed since then and intensive research has been carried out on this topic, many questions arising from this discovery have not yet been answered or only partially. To date, no generally valid explanation of the underlying mechanism of the voltage dependence of GPCRs has been described. In the meantime, different groups of GPCRs have been examined on their voltage dependence. A group with a wide distribution in the human body, with only limited information accessible concerning this aspect before this study was carried out, is the prostanoid receptor group. The starting point for this study was an investigation of megakaryocytes that suggested activation of endogenous thromboxane receptors (TP receptors) in the presence of an agonist upon depolarization (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Due to the lack of linearity in the measurement of calcium levels used for receptor activity, neither a qualitative nor a quantitative analysis of the voltage effect could be carried out. We used in FRET biosensors, which directly reflected the TP receptor activity and thus made it possible to characterize the voltage effect. In the context of this work, a FRET-based TP receptor conformation sensor was cloned. The actual investigation of the voltage dependence was carried out with a combination of FRET measurement as a measure of the receptor activity and simultaneous patch-clamp measurement to control the membrane potential. We observed a robust voltage dependence of the TP receptor both at the receptor level and on the downstream signal level. TP receptor activity doubled upon depolarization from -90 mV to +60 mV in the presence of U46619, a stable analog of prostaglandin H_2 . The half-maximal voltage effect $V_{0.5}$ determined for the TP receptor was -46 mV, which was within the physiological range of V_M . We were also able to show that the voltage effect mainly modulated the affinity of the TP receptor for U46619. Beside other findings pointing in this direction, we observed that the EC_{50} for U46619 at -90 mV was left shifted about 4.5 times compared to the EC_{50} at +60 mV and both curves had the same maximum. We tested the voltage effect on the TP receptor, activated with differently substituted prostanoid derivatives, each of which carried modifications at different positions around the molecule. All ligands tested showed activation upon depolarization, which indicated a more global change in the TP receptor conformation due to depolarization. Our finding fits with the observation that none of the point mutations we performed, in positions important for ligand binding of the TP receptor, led to a change in the voltage dependence of

Summary

the TP receptor. Consequently, there was no evidence for a specific modulation of the receptor-ligand interaction by changes in membrane potential.

Furthermore, we were able to show that the range and strength of the voltage dependence was restricted by R295^{7,40}, an amino acid that is situated in the agonist pocket. The modulation of ligand-induced receptor activity by V_M was not limited to the TP receptor, since the prostaglandin F receptor (FP receptor) activated with U46619 and the prostaglandin E₂ receptor - subtype 3 (EP3 receptor) activated with Iloprost showed a similar reaction to the depolarization as observed for the TP receptor activated with U46619. In contrast, IP receptor activated with Iloprost showed no detectable voltage dependence. The difference in voltage dependence could not be attributed to individual charged amino acids, which is why a more complex difference can be assumed as the reason for the different voltage dependence. Within this study, the PAR1 was also examined with the particularly sensitive $G\alpha_{13}$ -p115-FRET interaction *Assay*, here it turned out, that the PAR1 activated with thrombin was not modulated by changes in V_M .

While searching for a ligand-specific voltage dependence, Daltroban, a TP receptor antagonist, for which there was evidence of partial agonism, was examined. To our surprise, it turned out that at high concentrations Daltroban converted from an antagonist to partial agonist, which transiently activated the TP receptor. Because of these remarkable findings, the observed Daltroban effect was further investigated. It was shown that the TP receptor had a reduced capability to be activated, after administration of Daltroban, whereby it remained unclear whether Daltroban bound (pseudo-) irreversibly to the receptor. Contacts between Daltroban and the orthosteric binding site played a role in the partial agonistic effect. Different Daltroban derivatives were tested to investigate the structure-activity relationship of Daltroban. However, the underlying mechanism has remained unclear and will be the subject of future research.

Furthermore, a systematic approach to clone FRET-based GPCR receptor sensors was developed in this work, since these sensors can be of great value for future direct studies of the quality and quantity of the voltage effect on the ligand-induced GPCR activity. In this work, FRET-based GPCR receptor sensors for IP receptor, FP receptor and ET_B receptor were successfully cloned.

3 Einleitung

Alle eukaryotischen Zellen umgibt eine Zellmembran. Diese Membran besteht aus einer Doppelschicht amphiphiler Phospholipide, die eine Diffusionsbarriere insbesondere für geladene Teilchen darstellt. In diese Doppelmembran sind Proteine eingebettet. Zu den maßgeblichen Eigenschaften lebender Zellen zählt eine elektrische Potentialdifferenz zwischen dem Zellinneren und Zelläußeren – das so genannte Membranpotential. Das Membranpotential kommt durch elektrochemische Ionengradienten zustande, die sich aus teilchenspezifischen Membranpermeabilitäten ergeben. Aus dem Membranpotential resultiert ein starkes elektrisches Feld, das Werte im Bereich von 10^7 - 10^8 V/m erreicht und auf die eingebetteten Membranproteine wirkt (Owen N Vickery et al., 2016). Seit vielen Jahren ist bekannt, dass das Membranpotential eine Auswirkung auf die Funktion membranständiger Proteine haben kann. Das ist besonders gut für spannungsabhängige Ionenkanäle gezeigt, deren physiologische Funktion über die Änderung der Membranspannung reguliert wird. Vor 16 Jahren konnte überraschenderweise erstmals am Beispiel des muskarinischen Acetylcholinrezeptors 2 (M2AChR) gezeigt werden, dass auch die Funktion von Liganden-gebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) durch Änderung der Membranspannung moduliert werden kann. Diese Beobachtung konnte in den letzten Jahren auch für andere Liganden-gebundene GPCRs gemacht werden. Der zugrundeliegende Mechanismus der Spannungsabhängigkeit ist strittig und nach wie vor Gegenstand der Forschung. Viele GPCRs sind jedoch in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit nach wie vor wenig oder gar nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde die Spannungsabhängigkeit von Prostanoid-Rezeptoren, einer Gruppe von GPCRs über die in diesem Aspekt noch sehr wenig bekannt ist, untersucht. Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Untersuchung des Mechanismus der Spannungsabhängigkeit von GPCRs am Beispiel des Thromboxan-Rezeptors (TP-Rezeptor). Daltroban, ein TP-Rezeptor-Antagonist, der in klinischen Studien untersucht worden war und als neues Arzneimittel gescheitert ist, wurde als Ligand in dieser Studie untersucht und zeigte erstaunlicherweise eine transiente TP-Rezeptor Aktivierung und ein anschließendes reduziertes Ansprechen des TP-Rezeptors auf U46619. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass Daltroban in niedriger Konzentration einen Antagonismus aufwies und in hohen Konzentrationen zum Partialagonisten wurde. Die Untersuchung dieser Effekte führte zu einem eigenen Seitenthema. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine systematische Herangehensweise zur Generierung von FRET-basierten GPCR-Rezeptor-Sensoren entwickelt, da diese für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs ein wertvolles Werkzeug darstellen. Diese beiden Seitenthemen werden in dieser Einleitung nicht weiter gesondert eingeführt, sondern in den jeweiligen Ergebnisteilen näher eingeleitet.

3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

3.1.1 Allgemein

Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren handelt es sich um integrale Membranproteine. Sie stellen mit über 800 Vertretern die größte Rezeptorfamilie im menschlichen Genom dar. Die Gesamtheit der GPCRs der Wirbeltiere lässt sich aufgrund phylogenetischer Merkmale in fünf Familien unterteilen: Die Rhodopsin Familie (Klasse A) mit der größten Anzahl an Vertretern (701, davon 241 nicht-olfaktorisch), die Glutamat Familie (Klasse C, 15 GPCRs), Adhäsions-Rezeptoren (24 GPCRs), Frizzled/Taste2 Rezeptoren (24 GPCRs) und die Sekretin-Familie (15 GPCRs) (Fredriksson *et al.*, 2003). Die Rhodopsin Familie weist verschiedene Charakteristiken auf wie das NPXXY Motiv und das D(E)-R-Y Motiv, die eine wichtige Rolle bei der Rezeptoraktivierung spielen (Fredriksson *et al.*, 2003). Im Folgenden fokussiert sich die Einleitung im Wesentlichen auf die Rhodopsin Familie, da diese für die vorliegende Arbeit entscheidend ist.

GPCRs sind de facto an allen wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen beteiligt und Zielstruktur für die Wirkung von 33% der zurzeit auf dem Markt befindlichen niedermolekularen Wirkstoffe (Santos 2017). Pharmazeutische Hersteller machen weltweit pro Jahr etwa 180 Milliarden Dollar Umsatz mit GPCR-basierten Medikamenten und GPCRs sind potentielle Ziele für zahlreiche neue Arzneistoffe (Hauser *et al.*, 2018).

GPCRs ermöglichen es extrazellulären Liganden spezifische Effekte in Zellen hervorzurufen. Diese Liganden können sehr unterschiedlicher Art sein: Ionen, organische Duftmoleküle, Amine, Peptide, Proteine, Lipide und Photonen (Fredriksson *et al.*, 2003). Obwohl GPCRs eine niedrige Sequenzhomologie aufweisen (Gether, 2000), völlig unterschiedliche Liganden binden und sich in ihrer physiologischen Rolle maßgeblich unterscheiden, weisen sie alle eine gemeinsame Struktur mit sieben transmembranären α -Helices (TMs) auf. Sie verankern die Rezeptoren in der Zellmembran und verbinden die extrazelluläre Ligandenbindetasche mit der intrazellulären G-Protein Bindetasche (Manglik and Kruse, 2017). Dies gilt allerdings nicht für lipidische GPCRs, da hier die Ligandenbindetasche nach außen abgeschlossen ist und die Liganden diese wahrscheinlich über die Zellmembran erreichen (Audet and Stevens, 2019). Neben der gemeinsamen Struktur weisen sie auch einen gemeinsamen Signalmechanismus auf: Agonisten (aktivierende Liganden) führen eine Konformationsänderung des GPCRs herbei, wodurch dieser in die Lage versetzt wird heterotrimere G-Proteine zu aktivieren. GPCRs binden und aktivieren bestimmte G-Proteine besser als andere, so dass von einer entsprechenden Selektivität gesprochen werden kann. Inaktive heterotrimere G-Proteine binden GDP. Aktivierte GPCRs katalysieren den Austausch des gebundenen GDPs gegen GTP (Manglik and Kruse, 2017). Die aktivierten G-Proteine führen zu einer weiteren Signaltransduktion, die von der Art des G-Proteins abhängt und in der Folge zu einer Antwort auf zellulärer Ebene führt (Hilger

et al., 2018), Signaltransduktion wird ausführlich beschrieben in 3.2.1. Die beschriebene GPCR vermittelte Signaltransduktion wird durch spezifische Proteine, die Arrestine genannt werden, reguliert. Hierfür werden aktivierte GPCRs zunächst von G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinasen (GRKs) phosphoryliert. Die durch aktivierte und phosphorylierte GPCRs hervorgerufene Signaltransduktion kann durch Bindung von Arrestin an den Rezeptor abgeschaltet werden. Im Anschluss kann dieser Rezeptor Arrestin Komplex internalisieren (Hilger *et al.*, 2018).

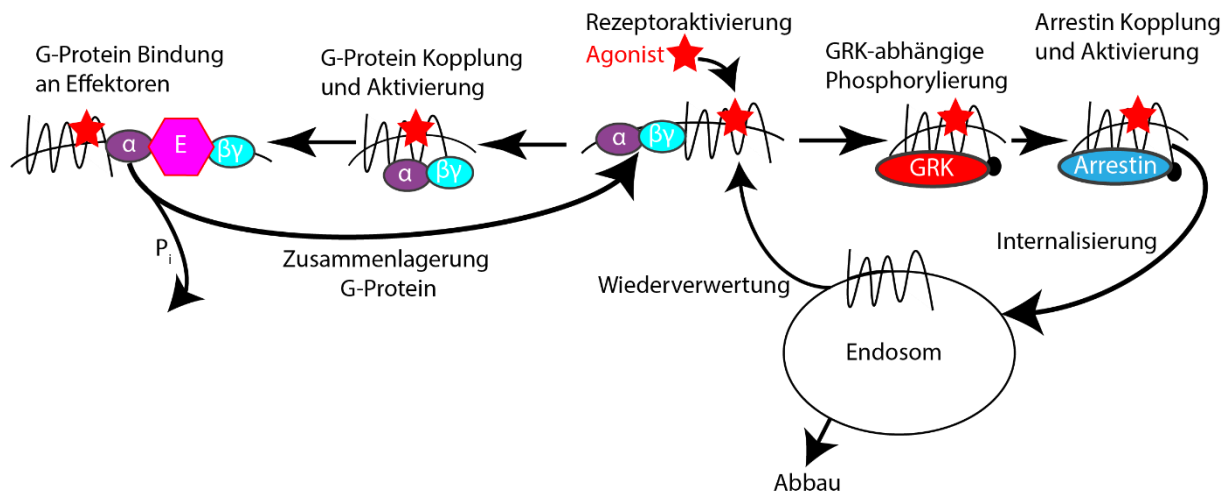


Abbildung 3-1 GPCR Signaltransduktion und deren Regulation Schematische Darstellung der GPCR Signaltransduktion und deren Regulation, modifiziert nach (Hilger *et al.*, 2018). Phosphorylierung wurde als schwarzer Kreis, der Agonist als Roter Stern dargestellt. „E“ in einem lila Sechseck steht für Effektorproteine.

Es gibt Liganden, die in der Lage sind bestimmte GPCRs verstärkt G-Proteine oder verstärkt Arrestin koppeln zu lassen (Latorraca *et al.*, 2017). Wie bereits erwähnt gibt es GPCRs, die unterschiedliche G-Protein Klassen koppeln können. Auch hier wurde bereits beobachtet, dass bestimmte Liganden in der Lage sind, den GPCRs in ihrer Spezifität bestimmte G-Proteine zu koppeln, beeinflussen konnten (Sivertsen *et al.*, 2013). Diese Liganden werden als „biased“ Liganden bezeichnet. Therapeutisch kann dieser „Bias“ für eine zielgerichtete Therapie von Nutzen sein.

Die meisten GPCRs weisen bereits ein gewisses Maß an basaler GTP-Austauschaktivität in Abwesenheit eines Agonisten auf, was darauf hindeutet, dass ein Equilibrium zwischen aktiven und inaktiven Rezeptoren besteht. Da aktivierende Liganden eine GPCR-Konformation stabilisieren, die mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren kann und so den Austausch von GDP zu GTP in der α -Untereinheit fördern, „schalten“ Agonisten GPCRs nicht einfach ein, sondern verschieben das Gleichgewicht hin zur aktivierenden Konformation (Weis and Kobilka, 2018).

3.1.2 Struktur und Aktivierung der GPCRs

Die Struktur von GPCRs ist nur schwer darzustellen, weil sie sehr flexibel, biochemisch instabil und nur in eukaryotischen Zellen herstellbar sind (Grisshammer, 2017). Erst Fortschritte in der Kristallographie haben die heute zur Verfügung stehende Bandbreite an GPCR Kristallstrukturen ermöglicht. Die erste hochauflösende GPCR Kristallstruktur wurde vom Lichtrezeptor Rhodopsin im inaktiven Zustand, stabilisiert durch kovalent gebundenes 11-cis-retinal, im Jahr 2000 publiziert (Palczewski *et al.*, 2000). Sieben Jahre später konnte dann mit dem β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 AR) zum ersten Mal ein GPCR im inaktiven Zustand mit einem nicht kovalent gebundenem Liganden kristallisiert werden (Cherezov *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007). 2011 konnte dann ebenfalls mit dem β_2 AR die erste aktive GPCR Struktur zusammen mit einem $G\alpha_s$ -Protein aufgelöst werden (Rasmussen, DeVree, *et al.*, 2011). Heute steht eine große Bandbreite an GPCR-Strukturen zur Verfügung, die Einblicke in den Aufbau und die Funktion von GPCRs ermöglichen; Übersichtsarbeit: (Shonberg *et al.*, 2015). Anhand des Vergleichs der inaktiven und aktiven Struktur des β_2 AR war zu erkennen, dass die größten Konformationsänderungen des Rezeptors bei Aktivierung durch Binden eines Agonisten an die orthosterische Bindestelle auf der intrazellulären Seite des Rezeptors an der G-Protein Bindestelle beobachtet werden konnten. An dieser ordneten sich TM5-7 neu an und machten so die G-Protein Bindestelle frei. Das C-terminale Ende der TM6 zeigt hier aus cytosolischer Sicht auf den GPCR eine Auswärtsbewegung um etwa 14 Å, siehe *Abbildung 3-2*. Die Auswärtsbewegung von TM5 hingegen war deutlich geringer ausgeprägt (Rasmussen, Choi, *et al.*, 2011; Rasmussen, DeVree, *et al.*, 2011).

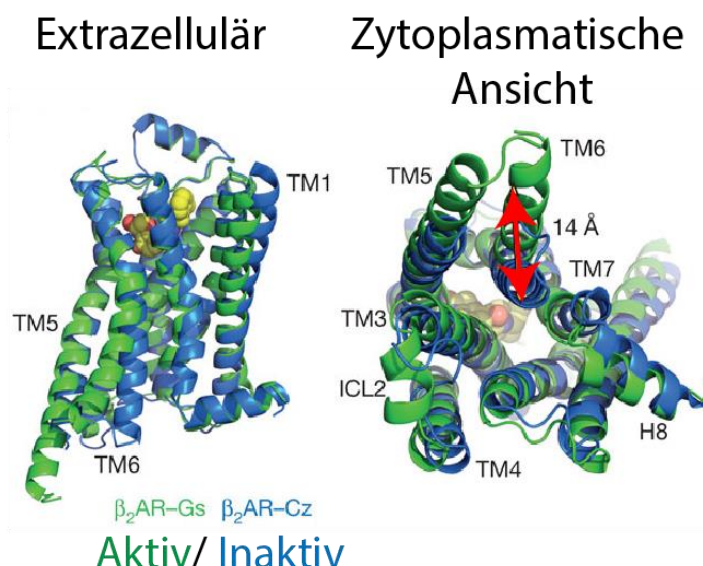


Abbildung 3-2 Vergleich der aktiven und inaktiven Kristallstruktur des β_2 AR Aus: (Rasmussen, DeVree, *et al.*, 2011). Zu sehen ist die inaktive (blau) und aktive (grün) Kristallstruktur des β_2 AR. In

der zytoplasmatischen Ansicht ist ein deutlicher Unterschied in der Position der TM6 mit einem Abstand von 14 Å zwischen inaktiv und aktiv zu erkennen (rote Pfeile).

Auch die Ligandenbindetasche ordnete sich neu an: es kam zu einer Volumenkontraktion durch hydrophile Kontakte des Liganden zu TM5, die TM5 zu TM6 zogen. Durch ligandeninduzierte GPCR Aktivierung war die intrazelluläre G-Proteinbindung begünstigt. Auf der anderen Seite erhöhte die Bindung von $\beta 2AR$ an ein G-Protein die Affinität des Rezeptors für den Agonisten (Latorraca *et al.*, 2017). Die Bindung eines vollen Agonisten führte nur in Anwesenheit eines G-Proteins zu einer vollen Aktivierung des $\beta 2ARs$ (Katritch *et al.*, 2013). Durch Simulationen konnte gezeigt werden, dass die Konformationsänderungen an der intrazellulären und extrazellulären Bindetasche lose miteinander verbunden waren (Latorraca *et al.*, 2017). Mittlerweile wurden weitere Klasse A GPCRs sowohl in aktiver, als auch inaktiver Konformation kristallisiert (Unter anderem: M2AChR, μ -opioid-Rezeptor und Rhodopsin (Venkatakrishnan *et al.*, 2016)). Die wichtigsten Unterschiede bestanden in der Interaktion zwischen Agonist und Ligandenbindetasche. Abgesehen davon waren die Konformationsänderungen grundsätzlich ähnlich zu den am $\beta 2AR$ beobachteten. Verschiedene konservierte Merkmale konnten für aktive GPCRs identifiziert werden: Die Auswärtsbewegung von TM6 konnte bei allen Strukturen aktivierter GPCRs beobachtet werden. Durch intramolekulare Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Konformations-Sensoren mit einem Fluorophor in der ICL3 und einem am C-Terminus konnte diese Konformationsänderung an GPCRs in Echtzeit dargestellt werden (Vilardaga *et al.*, 2003). Somit war es möglich die Kinetik der Rezeptor-Aktivierung verschiedener GPCRs zu messen. In einer ersten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungskinetiken sich von verschiedenen Rezeptortypen deutlich unterschieden. So war die Halbwertszeit ($t_{0,5}$) des adrenergen α_{2A} Rezeptors ($\alpha_{2A}AR$) bei ca. 40 ms, wohingegen die $t_{0,5}$ für den peptidischen Parathormonrezeptor bei etwa einer Sekunde lag. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Partialagonisten eine deutlich geringere Bewegung der TM6 induzieren (Vilardaga *et al.*, 2003). Mittlerweile gibt es solche FRET-basierten Rezeptor-Sensoren für über 20 verschiedene GPCRs (Kauk and Hoffmann, 2018).

Neben den in Kristallstrukturen beobachteten Konformationen konnten in MD-Simulationen unter anderem für den $\beta 2AR$ weitere metastabile, „intermediäre“ Strukturen für den Übergang eines Rezeptors aus dem aktiven in den inaktiven Zustand identifiziert werden (Dror *et al.*, 2011).

Die funktionelle Selektivität des GPCRs ist möglicherweise auf bestimmte Rezeptorkonformationen zurückzuführen. So wurde am ATII Typ I Rezeptor mittels Doppel Elektron Elektron Resonanz Spektroskopie beobachtet, dass dem Bias eine relativ kleine Konformationsänderung auf der zytosolischen Seite zugrunde lag und spezifische Konformationen zugeordnet werden konnten (Wingler *et al.*, 2019). Für die Kristallstrukturen von 5HT1B-R (ohne bias) und 5HT2B-R (mit bias), die beide mit

Ergotamin kristallisiert wurden, konnte möglicherweise ebenfalls ein Konformationsunterschied, der die Fähigkeit Arrestin oder G-Proteine zu aktivieren bestimmt, beobachtet werden (Wacker *et al.*, 2013).

3.2 Signalweiterleitung und Abschaltung

Aktivierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in der Lage G-Proteine zu aktivieren, die eine entsprechende Signaltransduktion einschalten, die schließlich in einer zellulären Antwort mündet. Aktivierte GPCRs können von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden. Entsprechend phosphorylierte und aktivierte GPCRs können mit Arrestinen interagieren, die verhindern, die GPCR von G-Proteinen zu entkoppeln und in der Lage sind unter bestimmten Umständen ein Internalisieren der GPCRs einzuleiten (Weis and Kobilka, 2018). Darüber hinaus wird kontrovers diskutiert, ob auch über Arrestine bestimmte Signalwege angeschaltet werden können (Grundmann *et al.*, 2018).

3.2.1 G-Proteine

Die eingangs erwähnten 800 im menschlichen Genom codierten GPCRs interagieren mit nur vier verschiedenen Hauptklassen von G-Proteinen, über die sie ihre Wirkung entfalten. Die durch GPCRs aktivierten heterotrimeren G-Proteine bestehen aus $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit. Die Art der G-Proteine wird durch den Typ der $G\alpha$ -Untereinheit festgelegt. Die Hauptklassen sind $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_s$, und $G\alpha_{12/13}$ (Simon *et al.*, 1991). Diese unterscheiden sich in ihrer spezifischen Effektorkopplung, nachgeschalteten Signaltransduktion und der hervorgerufenen Reaktion auf Zellebene. Insgesamt gibt es 16 verschiedene $G\alpha$ -, 5 $G\beta$ - und 12 $G\gamma$ -Untereinheiten (Hillenbrand *et al.*, 2015). GPCRs weisen in der Regel eine Selektivität für bestimmte $G\alpha$ -Untereinheiten auf. $G\alpha$ -Untereinheiten weisen zwei funktionelle Domänen auf: die GTP-Bindekasette und die helikale Insertion. Aktive GPCRs bewirken eine Konformationsänderung dieser beiden Strukturen, wodurch GDP dissoziieren kann (Wall *et al.*, 1998; Johnston and Siderovski, 2007). Das nukleotidfreie G-Protein bildet mit hoher Affinität einen Komplex mit dem Rezeptor (Hommers *et al.*, 2010). Da unter physiologischen Bedingungen die Konzentration von GTP in der Zelle zehnmal höher als die GDP Konzentration ist, bindet die α -Untereinheit mit entsprechender Wahrscheinlichkeit ein GTP. Durch die GTP Bindung wird die $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert, was zu einer Dissoziation der α -Untereinheit und dem $\beta\gamma$ -Dimer bzw. einer konformationellen Neuordnung führt (Oldham and Hamm, 2008; Vilardaga *et al.*, 2009).

Die $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheit besitzen jeweils einen Lipidanker und sorgen dadurch für die Membranständigkeit des heterotrimeren G-Proteins (Spiegel *et al.*, 1991). Sowohl GTP-gebundenes $G\alpha$, als auch $G\beta\gamma$ sind in der Lage unterschiedliche Effektormoleküle, wie Ionenkanäle und Enzyme (z.B.: Zyklasen und Kinasen) zu aktivieren. Die Aktivität von G-Proteinen ist selbstlimitierend durch die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit. Nach der Hydrolyse von GTP bildet $G\alpha(\text{GDP})$ wieder

mit $G\beta\gamma$ das inaktive G-Protein und steht zur Verfügung, um erneut durch aktive GPCRs aktiviert zu werden. Die Geschwindigkeit der Hydrolyse unterscheidet sich zwischen den verschiedenen G-Protein Unterfamilien (Johnston and Siderovski, 2007).

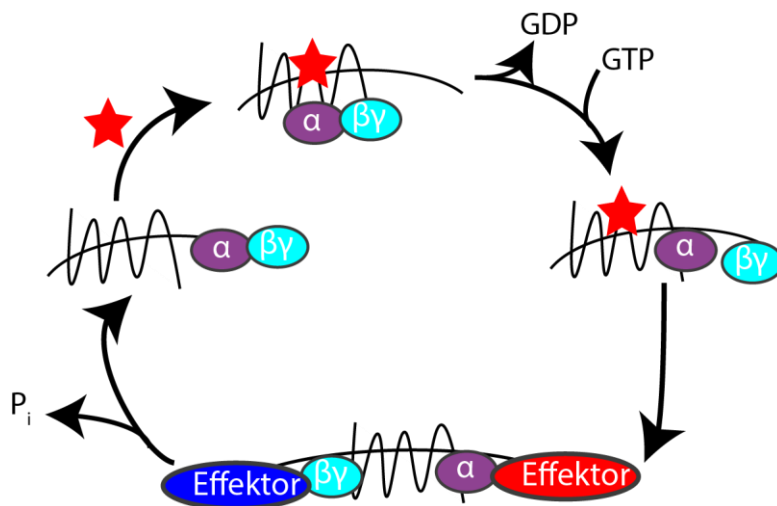


Abbildung 3-3 Schema des G-Protein Zyklus Modifiziert nach (Milligan and Kostenis, 2006). Mit einem roten Stern wurde ein Agonist dargestellt. P_i steht für Phosphat.

$G\alpha_s$ -Proteine werden aufgrund ihrer Fähigkeit Adenylylcyclasen zu aktivieren als stimulierende G-Proteine bezeichnet. Diese produzieren in der Folge cAMP und erhöhen so dessen Spiegel. cAMP ist ein sekundärer Botenstoff, der unterschiedlichen Zielstrukturen, wie z.B.: die Proteinkinase A und Epac (*Exchange protein directly activated by cAMP*), einen Austauschfaktor, aktiviert (Syrovatkina *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu stehen $G\alpha_i$ -Proteine, die auch als inhibitorische G-Proteine bezeichnet werden und über Hemmung von Adenylylcyclasen den cAMP Spiegel senken (Simon *et al.*, 1991). Weiterhin kann das $G\alpha_i$ -Protein durch seine $\beta\gamma$ -Untereinheit GIRK Kanäle direkt aktivieren. Bei dem GIRK (G protein-gated inwardly rectifying potassium; syn.: Kir3) Kanal handelt es sich um einen spezifischen einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanal. Die Grundlage der einwärts Gleichrichtung bildet ein extrinsischer Mechanismus bei dem die Kanalpore durch intrazelluläres Mg^{2+} und Polyamine verschlossen wird. GIRK Kanäle regulieren die Erregbarkeit in Herz und Gehirn (Glaaser and Slesinger, 2015). $G\alpha_{12/13}$ aktiviert Rho GTP- Austauschfaktoren (RhoGEFs). Diese wiederum aktivieren die GTPase RhoA und diese wiederum die Kinase ROCK, die insbesondere bei der Regulation des Zytoskeletts eine wichtige Rolle spielt (Suzuki *et al.*, 2009). $G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase C β , die wiederum Spaltung des Membranlipides Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) katalysiert. IP_3 bindet an IP_3 -Rezeptoren, die sich am endoplasmatischen Retikulum befinden. In der Folge kommt es zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen ins Cytoplasma. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Mizuno and Itoh, 2009).

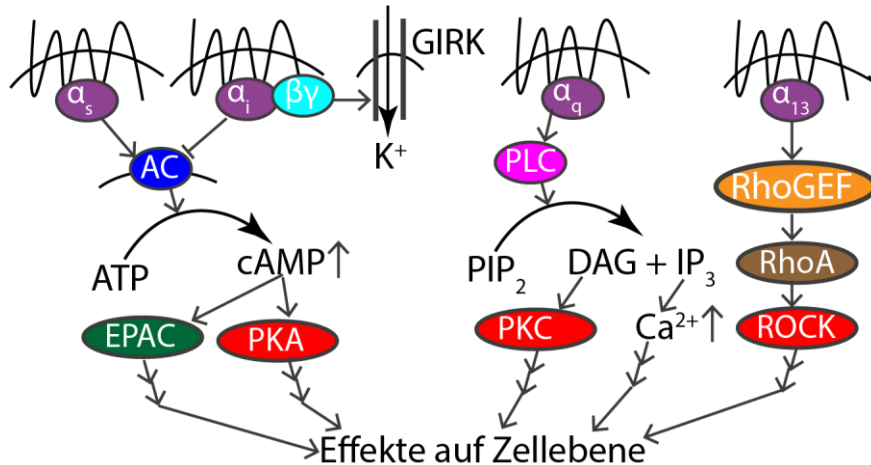


Abbildung 3-4 G-Protein-vermittelte Signalkaskaden Dargestellt sind ausgewählte Ausschnitte zu den wichtigsten G-Protein-vermittelten Signalkaskaden. Alle Abkürzungen sind im Text erklärt. Kinasen wurden in rot dargestellt (Simon *et al.*, 1991; Mizuno and Itoh, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Glaaser and Slesinger, 2015; Syrovatkina *et al.*, 2016).

3.2.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen und Arrestine

Als Reaktion auf einen extrazellulären Stimulus aktivieren GPCRs, wie bereits beschrieben, heterotrimere G-Proteine. Neben der Wegnahme des Agonisten gibt es die Möglichkeit die GPCR-vermittelten Signale durch Desensibilisierung des aktivierten Rezeptors auszuschalten bzw. zu modulieren. Der erste Schritt bei der Desensibilisierung stellt die Phosphorylierung des Rezeptors durch eine Klasse von Serin / Threonin-Kinasen, die als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) bezeichnet werden, dar (Gurevich and Gurevich, 2019). Arrestine können an aktivierte und phosphorylierte GPCRs binden und so die Signalweiterleitung durch sterische Abschirmung der G-Proteine vom Rezeptor unterbinden. Weiterhin wird über Arrestine für bestimmte Rezeptoren eine Internalisierung vermittelt und die Signalwege auf alternative G-Protein-unabhängige Signalwege wie den β -Arrestin-Signalweg umgeleitet (Moore *et al.*, 2007). Der letzte Punkt ist allerdings insbesondere durch neue Erkenntnisse aus Zelllinien, die frei von endogenen G-Proteinen waren und keine Arrestin-induzierten Signaländerungen zeigten, strittig (Grundmann *et al.*, 2018; Luttrell *et al.*, 2018).

3.3 Prostanoid Rezeptoren

Prostanoid Rezeptoren gehören zur Lipidrezeptorgruppe der Klasse A GPCRs. Die Prostanoid Rezeptoren sind jeweils benannt nach dem endogenen Agonisten mit der höchsten Affinität. Die Gruppe der Prostanoid Rezeptoren setzt sich aus dem Thromboxan A₂ Rezeptor und acht Prostaglandin Rezeptoren zusammen. Hierzu zählen: Der Prostazyklin-Rezeptor (IP-Rezeptor), der Prostaglandin F Rezeptor (FP-Rezeptor), die Prostaglandin D₂ Rezeptor Subtypen 1 und 2 (DP₁-Rezeptor und

DP₂-Rezeptor) und die Prostaglandin E₂ (PGE₂) Rezeptoren Subtypen 1 - 4 (EP₁-Rezeptor, EP₂-Rezeptor, EP₃-Rezeptor, EP₄-Rezeptor) (Hirata and Narumiya, 2012). Interessanterweise besitzt der IP-Rezeptor am C-Terminus eine CAAX Sequenz und wird isoprenyliert, was für seine Funktionsfähigkeit entscheidend ist (Hayes *et al.*, 1999). Verschiedene Prostanoidrezeptoren weisen unterschiedliche Isoformen auf. So unterscheidet man beim TP-Rezeptor zwischen α - und β -Isoform. Es handelt sich hierbei um unterschiedliche Spleißformen, die sich lediglich in der Länge ihres C-Terminus unterscheiden (Nakahata, 2008). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der α Isoform gearbeitet. Der EP₃-Rezeptor weist ebenfalls aufgrund von alternativen Spleißens zahlreiche Isoformen auf. Jede dieser Isoformen hat eine einzigartige Aminosäurezusammensetzung im C-terminalen Bereich, die laut (Kim *et al.*, 2013) eine Schlüsselrolle bei der Lokalisation des Rezeptors und dessen G-Protein-Kopplung spielen soll. In dieser Studie wurde EP₃-Rezeptor Isoform 1 verwendet. Die Prostanoiden, die natürlichen Liganden der Prostanoid-Rezeptoren, werden lokal enzymatisch über Cyclooxygenasen aus Arachidonsäure produziert und haben eine sehr kurze Lebensdauer. Neben den Prostaglandinen gibt es sogenannte Isoprostanoiden. Diese werden nicht-enzymatisch bei oxidativem Stress in einer von freien Radikalen katalysierten Peroxidation aus Arachidonsäure produziert. 8-Iso-Prostaglandin E₂ wird als Marker für oxidativen Stress eingesetzt. Isoprostaglandine können aber auch über Prostanoiden vermittelte biologische Effekte herbeiführen (Milne *et al.*, 2014). Neben der Affinität für bestimmte Liganden unterscheiden sich Prostanoid Rezeptoren auch dadurch, an welches G-Protein sie vorwiegend koppeln. So koppeln TP-Rezeptor und FP-Rezeptor vornehmlich an G α_q . Für EP₁-Rezeptor ist die G-Protein Präferenz noch unklar (Hirata and Narumiya, 2012). Der TP-Rezeptor koppelt weiterhin an G $\alpha_{12/13}$ (Nakahata, 2008). IP-Rezeptor, EP₂-Rezeptor, EP₄-Rezeptor und DP₁-Rezeptor hingegen an G α_s und EP₃-Rezeptor und DP₂-Rezeptor an G α_i (Hirata and Narumiya, 2012). Prostanoid Rezeptoren erfüllen eine große Bandbreite an physiologischen Funktionen. Dies ist auch an den unterschiedlichen Krankheiten zu erkennen, bei denen sie arzneilich angesteuert werden. Ausführlich beschrieben in Abschnitt 3.3.3.

3.3.1 Struktur der Prostanoidrezeptoren und Bindungsmodus

Die Sequenzhomologie der Prostanoidrezeptoren ist mit 19-41% deutlich geringer als die von beispielsweise muskarinischer Rezeptoren (Fredriksson *et al.*, 2003). In TM7, in ECL2, in TM3 (Narumiya *et al.*, 1999) und in TM1 (Fredriksson *et al.*, 2003) gibt es einige für Prostanoiden typische und konservierte Motive. Für Lipidrezeptoren, zu denen Prostanoid Rezeptoren gehören, konnte gezeigt werden, dass sie eine eng gefaltete, extrazelluläre Domäne aufweisen, wodurch die Ligandenbindestelle von dem Extrazellulärraum abgeschirmt ist. Dies ist bisher für keine andere Gruppe von GPCRs beobachtet worden (Audet and Stevens, 2019). Mittlerweile wurden Kristallstrukturen zu vier verschiedenen Prostanoidrezeptoren publiziert: TP-Rezeptor (Fan *et al.*, 2019), EP₃-Rezeptor (Audet *et*

al., 2019), DP₂-Rezeptor (Wang *et al.*, 2018) und EP₄-Rezeptor (Toyoda *et al.*, 2019). Für TP-Rezeptor, EP₃-Rezeptor und EP₄-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die Bindetasche vom Extrazellarraum durch ECL2, die sich wie ein Deckel auf die Bindetasche gelegt hat, abgeschirmt wurde, siehe *Abbildung 3-5A*. Beim TP-Rezeptor legte sich der N-Terminus wie eine zweite Schicht auf die ECL2. Wahrscheinlich tritt der Ligand über die Membran in einer Lücke zwischen TM1 und TM7 in den Rezeptor und die Bindestelle ein (Hollenstein, 2019). Der Mechanismus für die Bindung an DP₂-Rezeptor, der auch bezogen auf die Sequenz ein untypischer Prostanoid Rezeptor ist und ursprünglich als Chemokinrezeptor klassifiziert wurde, war völlig ohne Gemeinsamkeit mit den drei anderen Rezeptoren und wird im Folgenden nicht weiter einbezogen. Für die anderen drei Liganden konnte der vorhergesagte Kontakt zwischen der Carboxylgruppe der Prostanoiden und dem Arginin in Position 7.40 bestätigt werden, für Ligandenbindung der Prostanoid-Rezeptoren siehe *Abbildung 3-5B*. Neben diesem Kontakt weist die Carboxylgruppe einen Kontakt zu einem Wasserstoffbrückendonator in 2.65 und in ECL2 auf. Für die relativ hochaufgelöste Struktur des EP₃-Rezeptors konnte ein gebundenes Wassermolekül, das die Interaktion des E Rings des Liganden und dem Rezeptor vermittelt, beobachtet werden. Der Kontakt zwischen der ω -Kette und W^{6.48} gilt als ausschlaggebend für die Rezeptor-Aktivierung. Übersichtsarbeit in (Hollenstein, 2019).

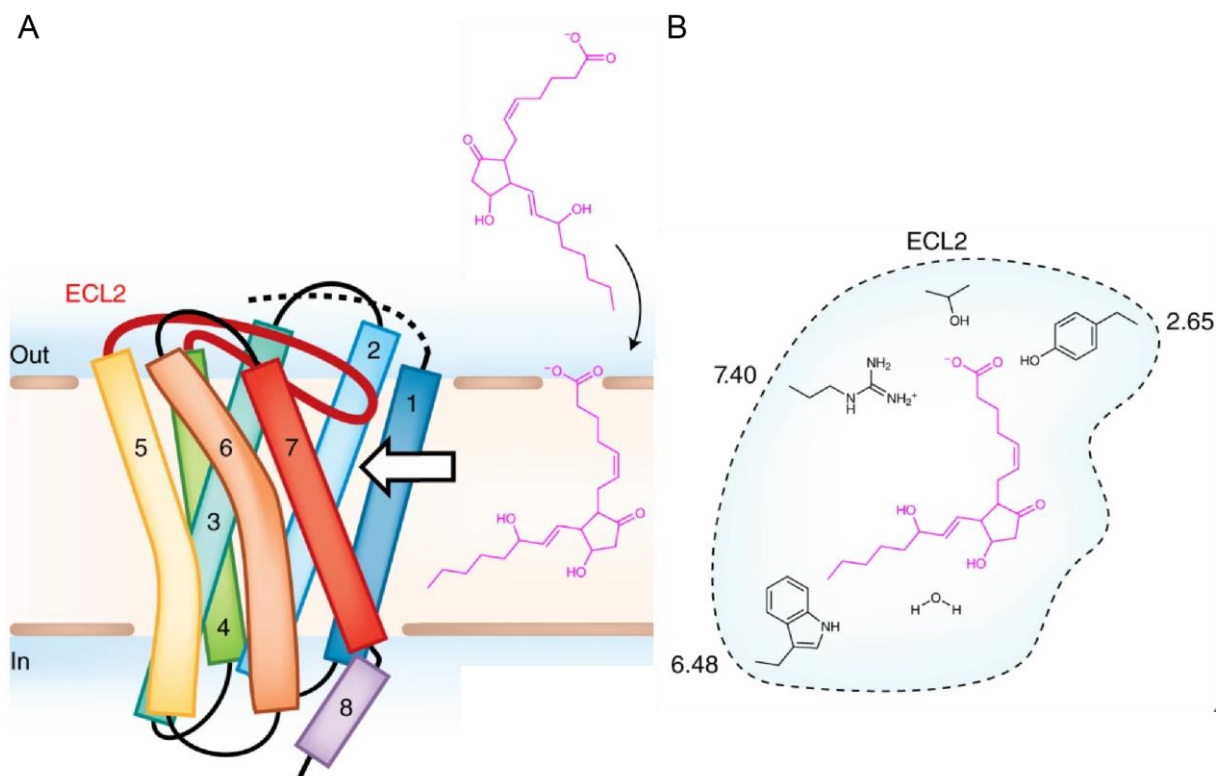


Abbildung 3-5 Rezeptorstruktur und Ligandenbindung der Prostanoid-Rezeptoren Modifiziert nach (Hollenstein, 2019) (A) Zu sehen ist eine schematische Darstellung der Rezeptorstruktur von Prostanoid-Rezeptoren, basierend auf den Kristallstrukturen von EP₃-, EP₄- und TP-Rezeptor. Es ist zu erkennen, dass die Ligandenbindetasche durch ECL2 (rot) nach außen völlig abgeschlossen ist. Für

TP-Rezeptor bildet der N-Terminus (gestrichelte schwarze Linie) eine zweite abschließende Schicht. Der Eintritt des Liganden, hier beispielhaft PGE_2 (magenta) gezeigt, erfolgt über die Zellmembran zwischen TM1 und TM7. (B) Dargestellt wurde PGE_2 zusammen mit in der Ligandenbindetasche konservierten Aminosäuren der Prostanoid-Rezeptoren.

3.3.2 Bildung der Prostanoiden und Isoprostanoiden sowie deren Abbau

Prostanoiden, die endogenen Liganden der Prostanoidrezeptoren, zählen zu den Eicosanoiden und werden aus Arachidonsäure gebildet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Biosynthese der Prostanoiden ist die Freisetzung des Substrats Arachidonsäure aus Phospholipiden der Zellmembran durch Phospholipase A_2 . Die weitere Umsetzung erfolgt im Fall der Prostanoidsynthese durch Cyclooxygenasen (COX) (Hirata and Narumiya, 2012). Es gibt zwei verschiedene Isoformen: COX-1, die konstitutiv in den meisten Zellen exprimiert wird, und COX-2, deren Expression induzierbar ist. Durch COX wird Arachidonsäure in einem zweistufigen Prozess über das Endoperoxid Prostaglandin G_2 zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) umgesetzt. Aus PGH_2 können über entsprechende Enzyme die Prostanoiden gebildet werden (Simmons *et al.*, 2004). Welche der Prostanoiden von einer bestimmten Zelle gebildet werden, ist abhängig von der zellulären enzymatischen Ausstattung. Über drei verschiedene PGE_2 Synthasen kann PGE_2 gebildet werden. Dies ist in den meisten Körperzellen möglich. Die Bildung von PGD_2 ist über zwei verschiedene PGD_2 -Synthasen möglich. Zellen mit der entsprechenden Ausstattung finden sich hauptsächlich im hämatopoetischen System sowie im Immunsystem und im ZNS. Die übrigen Prostanoiden $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 und TXA_2 werden jeweils durch eine spezifische Synthase gebildet (Hirata and Narumiya, 2012). Das chemische Grundgerüst der Prostanoiden ist die Prostansäure, eine gesättigte Carbonsäure mit 20 C-Atomen (Oesterling *et al.*, 1972). Diese enthalten eine α -Kette und eine ω -Kette, die über einen Ring verbunden sind (Ungrin *et al.*, 2001), siehe *Abbildung 3-6*.

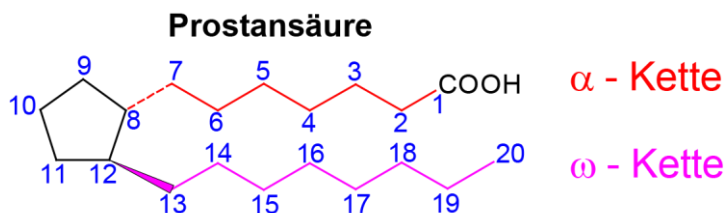


Abbildung 3-6 Struktur der Prostansäure Die α -Kette der Prostansäure wurde rot und die ω -Kette pink hervorgehoben.

Es gibt ein-, zwei- und dreifach ungesättigte Prostanoiden, wobei die zweifach ungesättigten die größte biologische Relevanz haben und daher hier im speziellen betrachtet werden (Nelson and Raskin, 2019). Die einzelnen Prostanoiden unterscheiden sich, abgesehen von Prostacyclin, das eine völlig andere Struktur aufweist, nur durch ihren zentralen Ring, siehe *Abbildung 3-7*. Die resultierenden Affinitäten der einzelnen Prostanoiden für die verschiedenen Prostanoid-Rezeptoren unterscheiden sich dafür

allerdings enorm (Abramovitz *et al.*, 2000). In einer am EP₁-Rezeptor durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die Carboxylgruppe in Position C1 sehr wesentlich für die Wirkung von Agonisten sowie die Anwesenheit und Konfiguration von Hydroxylgruppen in Position 11 und 15 eine kritische Rolle in der Agonist Aktivität spielt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Lipophilisierung des ω-„Schwanzes“ die Agonist Potenz steigerte (Ungrin *et al.*, 2001).

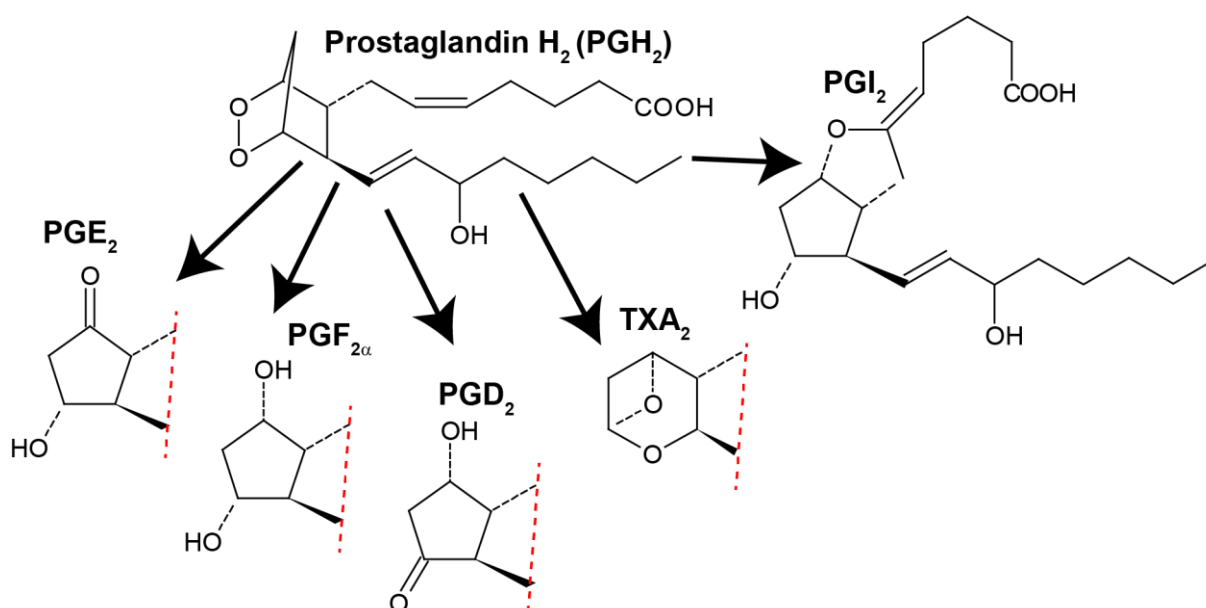


Abbildung 3-7 Ausschnitt aus der Prostaglandinbiosynthese Modifiziert nach Abbildung 8.22 aus Steinhilber *et al.*, Medizinische Chemie, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag 2010 (Steinhilber *et al.*, 2010).

Die Wirkung der Prostanoiden ist auf die nähere Umgebung ihrer Produktion begrenzt, da sie innerhalb von Minuten bis Sekunden inaktiviert werden. Einige Prostanoiden werden durch spezifische Enzyme abgebaut, andere zerfallen spontan (Freissmuth *et al.*, 2016). Zu den spontan Zerfallenden zählt TXA₂, das mit einer t_{0,5} von 30 s durch nicht enzymatische Hydrolyse zu TXB₂ zerfällt (Needleman *et al.*, 1976). Die Tatsache, dass sich das biologisch wirksame TXA₂ und das unwirksame TXB₂ lediglich in ihrem Ring unterscheiden, unterstreicht die Wichtigkeit des Ringes für die Funktion (Nakahata, 2008). Prostanoiden, die in den systemischen Kreislauf gelangen, werden bei der ersten Passage durch den Lungenkreislauf quasi vollständig abgebaut. Der wichtigste Initialschritt ist die Oxidation der OH-Gruppe in Position 15 (Freissmuth *et al.*, 2016).

Neben den Prostanoiden gibt es als weitere Gruppe endogener Liganden für die Prostanoid-Rezeptoren, die bereits erwähnten Isoprostanoiden (Morrow *et al.*, 1990). Diese sind Prostanoidisomere, die sich durch eine chirale Inversion an C8 von den entsprechenden Prostanoiden unterscheiden. Sie werden nicht-enzymatisch unter oxidativem Stress in einer von freien Radikalen katalysierten Lipidperoxidation

aus Arachidonsäure produziert. Dies geschieht im Gegensatz zu Prostanoiden nicht (nur) mit freier Arachidonsäure, sondern in situ an Phospholipid gebundener Arachidonsäure an der Zellmembran. Die Freisetzung kann dann ebenfalls über die Phospholipase A₂ katalysiert werden. Eine Freisetzung für bestimmte Isoprostanoide konnte auch durch die Plättchenaktivierenden Faktor-Acetylhydrolase gezeigt werden. Oxidativer Stress ist charakterisiert als eine Stoffwechsellage, in der sich die Balance zwischen oxidativen und antioxidativen Faktoren im Körper zugunsten der oxidativen Faktoren verschiebt. Hierbei kommt es zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was mit einer Reihe von verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird. Isoprostanoide, insbesondere 8-Iso-PGE₂, sind ein etablierter Marker für oxidativen Stress. Deren Quantifizierung erfolgt im Wesentlichen aus Urinproben. Darüber hinaus können Isoprostanoide auch über Prostanoid Rezeptoren vermittelte biologische Effekte herbeiführen, deren physiologische Relevanz allerdings noch ungeklärt ist (Milne *et al.*, 2014). Isoprostanoide sind im Gegensatz zu Prostanoiden chemisch stabil (Czerska *et al.*, 2016).

3.3.3 Physiologische Funktionen und arzneilicher Nutzen der Prostanoid-Rezeptoren

Die physiologischen Funktionen der Prostanoid-Rezeptoren sind umfangreich. Im Folgenden werden einige Beispiele aufgezeigt, um deren Wichtigkeit zu unterstreichen. Ebenso werden einige Arzneimittel beschrieben, die direkt oder indirekt an Prostanoid-Rezeptoren angreifen. So spielt der TP-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase. Hierbei kommt es $G\alpha_{13}$ vermittelt zu einer Veränderung der Form der Thrombozyten und $G\alpha_q$ vermittelt zu einer Thrombozytenaggregation. Das zur TP-Rezeptor-Aktivierung notwendige TXA₂ wird COX-1-abhängig in Thrombozyten nach Aktivierung gebildet und führt neben der Thrombozytenaggregation zu einer Vasokonstriktion (Nakahata, 2008). Dem wirkt der IP-Rezeptor durch eine Vasodilatation und eine Thrombozytenaggregationshemmung entgegen. Dieser Rezeptor ist ebenfalls auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert und wird durch PGI₂ aktiviert. PGI₂ wird aus Endothelzellen, induziert durch Scherkräfte des vorbeifließenden Blutes, ausgeschüttet. IP-Rezeptor und TP-Rezeptor weisen einen funktionellen Antagonismus auf (Woodward *et al.*, 2011). Die Hemmung der Thromboxan-Rezeptor-Wirkung spielt bei der Therapie zahlreicher Erkrankungen, insbesondere kardiovaskulärer, eine wichtige Rolle (Woodward *et al.*, 2011). Acetylsalicylsäure (ASS), die seit 1977 auf der „Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation“ steht, hemmt den TP-Rezeptor indirekt durch Synthesehemmung des endogenen Liganden Thromboxan. Dies geschieht durch eine irreversible Acetylierung der COX1 im aktiven Zentrum, bei Gabe einer niedrigen Dosis ASS relativ selektiv in Thrombozyten. In Deutschland gibt es aktuell keine zugelassenen direkten Thromboxanrezeptorantagonisten. In Japan hingegen ist der direkte Thromboxan-Rezeptor-Antagonist Seratrodast in der Behandlung von Asthma seit 1997 zugelassen. Mit Ramatroban, das neben dem TP-Antagonismus auch einen DP₂-Antagonismus aufweist und ebenfalls in Japan zugelassen ist, gibt es auch einen TP-Antagonisten mit Indikation allergische

Rhinitis. Weiterhin wird eine Rolle des TP-Rezeptors bei Krebs diskutiert. Zurzeit befindet sich mit Ifetroban ein TP-Rezeptor-Antagonist in Phase II als Medikament zu Behandlung maligner solider Tumore mit hohem Metastaserisiko (NCT03694249). Der IP-Rezeptor wird therapeutisch bei der Behandlung der pulmonalen Hypertonie mit IP-Rezeptor-Agonisten, wie z.B. dem PGI₂-Derivat Iloprost, angesteuert (Whittle *et al.*, 2012). Interessanterweise ist Iloprost nicht IP-Rezeptor spezifisch, sondern bindet mit gleicher Affinität an EP₁-Rezeptor und bindet ebenfalls mit nennenswerter Affinität am EP₃-Rezeptor (Abramovitz *et al.*, 2000). Der FP-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle zur Tonusregulation im Uterus. Weiterhin wird der FP-Rezeptor am Corpus luteum hoch exprimiert. Erstaunlicherweise spielt er beim Menschen allerdings in Bezug auf Luteolyse keine maßgebliche Rolle, weswegen hier angreifende Arzneimittel auch keine Kontrolle der menschlichen Fertilität aufweisen. Im Gegensatz dazu können Agonisten wie Cloprostenol zur Zyklussynchronisation von Nutztieren verwendet werden (Coleman *et al.*, 1994). Weiterhin werden FP-Rezeptoren im Auge exprimiert, weswegen lokale FP-Rezeptor-Agonisten wie Latanoprost, Travoprost, Tafluprost oder Bimatoprost in der Augenheilkunde zur Senkung des Augeninnendrucks bei primärem Offenwinkelglaukom eingesetzt werden können (Coleman *et al.*, 1994). PGD₂ ist das Hauptprostaglandin, das von aktivierten Mastzellen gebildet und freigesetzt wird. Es wirkt vasodilatierend und hemmt die Thrombozytenfunktion. In den Bronchien wirkt es vasokonstriktorisches. Der DP₁-Rezeptor spielt vor allem eine Rolle bei der Dilatation am Gefäßsystem. DP₂-Rezeptor spielt eine Rolle für die Chemotaxis (Hirata and Narumiya, 2012). EP₂-Rezeptor und EP₄-Rezeptor wirken vasodilatierend. EP₄-Rezeptor spielt eine besondere Rolle bei der Offenhaltung des Ductus arteriosus Botalli. Der Ligand PGE₂ wirkt über EP-Rezeptoren pronozizeptiv und ist bei akuten, lokalen Entzündungsreaktionen einer der wesentlichen Mediatoren, die eine lokale Vasodilatation sowie Ödembildung hervorrufen. EP₃-Rezeptor Aktivierung im Hypothalamus führt zu einer Sollwerteinstellungsänderung der Körpertemperatur (Hirata and Narumiya, 2012). Das PGE₁-Derivat Misoprostol und das PGE₂-Derivat Sulproston kommen im Rahmen der Abortinduktion zur Anwendung (Marret *et al.*, 2015). Der bereits angesprochene Einfluss von Prostanoid-Rezeptoren auf die Entwicklung und das Wachstum von Krebs sind sehr vielfältig (O'Hayre *et al.*, 2014). Im Allgemeinen wird angenommen, dass die von GPCRs angeschalteten, in diesem Kontext relevanten, Signalwege der AKT / mTOR-, MAPK- und Hippo-Signalweg sind. Darüber hinaus spielen GPCRs bei der Invasion und Metastasierung von Krebszellen durch Aktivierung von Rho-GTPasen und Veränderungen des Zytoskeletts sowie durch Angiogenese, um den Tumor mit Nährstoffen zu versorgen und Wege für die Metastasierung bereitzustellen, eine wichtige Rolle (O'Hayre *et al.*, 2014). So tragen GPCRs zur Schaffung und Aufrechterhaltung einer für Tumore geeigneten Umgebung bei. Für diese Prozesse sind auch Prostaglandine wichtig. Unter anderem konnte dies für die Förderung der Tumor induzierten Angiogenese gezeigt werden. So gehören zu den angiogenetischen Faktoren mit Wirkung auf Endothelzellen auch Prostaglandine (O'Hayre *et al.*, 2014). Über die Induktion der COX2 durch Entzündungen gibt es auch eine Verbindung zwischen

Entzündungen und Krebs (O'Hayre *et al.*, 2014). Prostaglandin-vermittelte Wirkungen tragen zu einem für Krebs geeigneten Mikroklima bei. Mittlerweile wurden unterschiedlichste Krebsarten beschrieben, bei denen Prostanoid-Rezeptoren eine Rolle spielen (O'Hayre *et al.*, 2014). Ein prominentes Beispiel, über das gerade in letzter Zeit verstärkt publiziert wurde, sind die $G\alpha_s$ -gekoppelten EP₂- und EP₄-Rezeptoren im Zusammenhang mit Darmkrebs (Pannunzio and Coluccia, 2018).

3.4 Spannungsabhängigkeit G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Für verschiedene von GPCRs vermittelte Signalwege konnte bereits vor vielen Jahren Spannungsabhängigkeit gezeigt werden. So war beispielsweise die präsynaptische M2AChR vermittelte Inhibierung der ACh-Freisetzung abhängig vom Membranpotential (V_M) (Doležal and Tuček, 1999; Slutsky *et al.*, 1999). Auch für durch GPCRs angeschaltete $G\alpha_q$ -vermittelte Signalwege konnte eine Spannungsabhängigkeit gezeigt werden (Ganitkevich and Isenberg, 1993; Mahaut-Smith *et al.*, 1999; Mason and Mahaut-Smith, 2001). Ein interessantes Beispiel für einen diesbezüglich gut untersuchten Zelltyp sind Thrombozyten. In Thrombozyten werden zahlreiche Effekte über GPCRs vermittelt, z.B.: über ADP-Rezeptoren, adrenerge Rezeptoren und Protease aktivierte Rezeptoren. Bei Thrombozyten bewirkte eine Depolarisation eine Verstärkung der ADP-abhängigen Aktivierung (Friedhoff and Sonenberg, 1983), eine Verstärkung der Aggregationswirkung von ADP, Adrenalin und Kollagen (Pales *et al.*, 1988) und eine Inhibierung des durch Thrombin vermittelten Effektes auf den Calciumspiegel, sowie der durch Thrombin vermittelten Aggregation (Kovács *et al.*, 1990). Eine Hyperpolarisation des Thrombozytenruhemembranpotentials von -58 mV auf bis zu -69 mV, hervorgerufen durch von Endothelzellen produzierte Epoxyeicosatriensäuren, führte zu einer Inhibierung der durch ADP hervorgerufenen P-Selektin Expression und somit zu einer Inhibierung der Adhäsion von Thrombozyten (Krotz *et al.*, 2004).

Im Jahr 2003 konnte die beobachtete Spannungsabhängigkeit zum ersten Mal auf Ebene eines GPCRs, für den M2AChR, gezeigt werden (Ben-Chaim *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde die Rezeptoraktivität des M2AChR anhand der Aktivität eines nachgeschalteten GIRK Kanals, als Kaliumstrom mittels Elektrophysiologie untersucht. Die Gruppe konnte in dieser Arbeit zeigen, dass die Spannungsabhängigkeit nur zu beobachten war, wenn der GIRK Kanal durch den M2AChR angeschaltet wurde. Diese Beobachtung konnte für den P₂Y₁ bestätigt werden. Hier verschwand die Spannungsabhängigkeit des durch P₂Y₁ angeschalteten Signalwegs durch einen Knockout von P₂Y₁ (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Seitdem konnte für eine Reihe von GPCRs aus der Rhodopsin- und der Glutamat-Familie Spannungsabhängigkeit nachgewiesen werden, siehe **Tabelle 3-1**. Übersichtsarbeit hierzu: (Owen N Vickery *et al.*, 2016). Die Spannungsabhängigkeit konnte sich von der Rezeptorebene bis auf Effektorebene fortpflanzen. So konnte die Spannungsabhängigkeit verschiedener durch Rezeptoraktivierung vermittelter Effekte beobachtet werden. Hierzu zählen eine GPCR

Konformationsänderung, die bereits erwähnten durch GIRK-Aktivierung induzierten Kaliumströme, Calcium induzierte Chloridströme, G-Protein-Aktivierung und Rezeptor-Arrestin Interaktion (z.B.: (Martinez-Pinna *et al.*, 2004; Sahlholm *et al.*, 2012; Rinne *et al.*, 2013; Birk, 2015). Diese Beobachtung konnte sowohl in Überexpressionssystemen, wie transfizierten HEK-Zellen und CHO-Zellen und Oozyten, als auch in nativen Zellen gemacht werden. So konnte in Megakaryozyten gezeigt werden, dass eine Depolarisation die durch P_2Y_1 sowie weitere $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren hervorgerufene Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels verstärkt (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Weiterhin konnte für den in Oozyten endogen vorkommenden LPA-Rezeptor ohne zusätzliche Transfektion ebenfalls eine Verstärkung der durch LPA-Rezeptor hervorgerufenen Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, sowie eine Erhöhung von durch LPA-Rezeptor hervorgerufenen Calcium-induzierten Chloridströme beobachtet werden (Martinez-Pinna *et al.*, 2010). Für den P_2Y -Rezeptor konnte gezeigt werden, dass ein *train* von Aktionspotentialen bei einer Frequenz von 1 Hz oder 0,2 Hz (Nachahmung eines Herzaktionspotentials) die rezeptorvermittelte, zelluläre Reaktion auf den Agonist verstärkt (Martinez-Pinna *et al.*, 2004). Auch der M1AChR reagierte auf “neuronale Stimulationsmuster” und zeigte eine Zunahme der Rezeptoraktivierung bei höherer Depolarisationsfrequenz (Hoppe *et al.*, 2018). Experimente an Oozyten deuten darauf hin, dass die Spannungsabhängigkeit des M2AChR die Neurotransmitterfreisetzung an Synapsen steuert (Kupchik *et al.*, 2011). Die Spannungsabhängigkeit endogener M2AChR modulierte die GIRK-Kanalströme in adulten Herzmuskelzellen (Navarro-Polanco *et al.*, 2013). In einer Studie, die die Spannungsabhängigkeit von M3AChR vermittelter Kontraktionen an Bronchialmuskulatur untersuchte, konnte die auf Rezeptor- und Signalprotein-Ebene beobachteten Effekte nicht auf Zellebene beobachtet werden. Die verwendete Depolarisation war den physiologischen Bedingungen nachempfunden. Diese sind gegenüber anderen Glattmuskelgeweben in den Bronchien besonders klein, wie die Autoren auch selbst kommentieren (Semenov and Brenner, 2018).

Bisher konnte die Spannungsabhängigkeit von GPCRs nur in Anwesenheit von Liganden beobachtet werden. In einer vor kurzem erschienenen Studie konnte ein Einfluss der Membranspannung auf die G-Protein-Kopplung eines basal aktiven M2AChR, in Abwesenheit von Liganden, nachgewiesen werden (Yair *et al.*, 2019). Auch in Abwesenheit funktionaler G-Proteine konnte Spannungsabhängigkeit für GPCRs beobachtet werden. Dies wurde am $\alpha_{2A}AR$ mittels simultaner FRET- und *Patch-Clamp* Messungen untersucht. Gemessen wurde ein FRET-basiertes intramolekulares Fusionsprotein des $\alpha_{2A}AR$, das Signaländerungen abhängig von der Rezeptoraktivität zeigt (Vilardaga *et al.*, 2003). Diese Messungen wurden in Zellen, deren endogene $G\alpha_i$ -Proteine durch Behandlung mit Pertussis-Toxin (PTX) inaktiviert wurden, durchgeführt (Rinne *et al.*, 2013). Dies konnte Analog für den M1AChR gezeigt werden. Hierfür wurde $G\alpha_q$ vom G-Protein Zyklus durch irreversible Aktivierung mittels einer großen Menge $GTP\gamma S$ entkoppelt (Tateyama and Kubo, 2013; Rinne *et al.*, 2015). Ein weiterer Hinweis darauf, dass das G-Protein selbst keinen Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit hatte, war eine Untersuchung der Spannungsabhängigkeit am M1AChR. Hier blieb Spannungsabhängigkeit

des M1AChR erhalten, auch wenn dieser statt mit $G\alpha_q$ mit einer C-terminalen Mutante von $G\alpha_{i3}$ interagiert und dies anhand von GIRK-Strömen untersucht wurde (Ben-Chaim *et al.*, 2006).

Für den M1AChR und den M2AChR konnte eine Ladungsverschiebung in Abhängigkeit von einer Änderung der Membranspannung beobachtet werden, wie sie zuvor bereits bei spannungsabhängigen Ionenkanälen beobachtet werden konnte. Die Autoren zeigten des Weiteren, dass eine gute Korrelation zwischen der Spannungsabhängigkeit der Ladungsverschiebung und der Spannungsabhängigkeit der Fraktion der Rezeptoren bestand, bei denen eine Verschiebung der Agonistenbindungsaffinität von hoch nach niedrig auftrat. Die für den M2AChR mit 0,85 e beobachtete Ladungsverschiebung war ca. zehnmal kleiner als die für Ionenkanäle mit S4 Segment (Bezaniila, 2000; Ben-Chaim *et al.*, 2006). Mittels FRET-Messungen unter kontrollierten Spannungsbedingungen konnte eine *gating charge* für den α_2 AR errechnet werden, die in etwa dem zuvor gemessenen Wert am M2AChR entsprach (Rinne *et al.*, 2013). Die intramembranäre Ladungsbewegung ist ein Mechanismus, durch den biologische Moleküle wie z. B. spannungsgesteuerte Ionenkanäle Änderungen des Membranpotentials mit Änderungen der Kanalkonformation verbinden und so zu ihrer Öffnung führen. Für den M2AChR konnte gezeigt werden, dass die durch Depolarisation induzierte Ladungsbewegung die Konformation an der orthosterischen Bindestelle des M2AChR verändern, was wiederum zu einer Änderung seiner Agonistenbindung führte (Dekel *et al.*, 2012).

Der Effekt der Spannungsabhängigkeit auf die GPCR-Aktivität war ligandenspezifisch. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist der M2AChR: Wird dieser mit Acetylcholin aktiviert, führt Depolarisation zu einer Deaktivierung, wird er mit Pilocarpin aktiviert, zu einer Aktivierung und wird er mit Bethanechol aktiviert, zu keiner messbaren Änderung der Rezeptoraktivität durch Spannungsänderung (Moreno-Galindo *et al.*, 2016). Eine ligandenabhängig unterschiedliche Richtung des Spannungseffektes konnte auch für den dopaminerge D2 Rezeptor (D2R), den β_1 AR und den M3AChR gezeigt werden (Sahlholm *et al.*, 2011; Birk *et al.*, 2015; Rinne *et al.*, 2015).

Bei der Beschreibung der Pharmakologie eines Liganden müssen zwei wichtige Parameter berücksichtigt werden: Die Affinität und die intrinsische Aktivität. Die Affinität ist ein Maß dafür, wie gut eine Substanz an ihr molekulares Ziel bindet, in dieser Studie an ihren GPCR. Die intrinsische Aktivität beschreibt die biologische Wirkung einer Substanz, bezogen auf die in dieser Studie untersuchten GPCRs, die direkte Wirkung eines Liganden auf das Rezeptormolekül selbst, d. h. dessen Fähigkeit, den Rezeptor zu aktivieren (Kenakin, 2006). Der zugrundeliegende Effekt der Spannungsabhängigkeit auf die GPCR-Aktivität und die Beeinflussung von Affinität und intrinsischer Aktivität war Liganden-spezifisch. Es gab sowohl Liganden-aktivierte GPCRs, bei denen eine Änderung der Affinität, als auch bei denen eine veränderte intrinsische Aktivität dem Spannungseffekt zugrunde lag. Beides konnte direkt und indirekt gezeigt werden. Eine Affinitätsänderung durch Spannungsänderung konnte direkt mittels Radioligandenexperimenten für den muskarinischen

M1AChR aktiviert mit [3 H]ACh und für den mGluR₁ aktiviert mit [3 H]Glutamat (hier jeweils Affinitätszunahme), sowie für den M2AChR aktiviert mit [3 H]ACh und den mGluR₃ aktiviert mit [3 H]Glutamat (hier jeweils Affinitätsabnahme) gezeigt werden (Ben-Chaim *et al.*, 2003; Ohana *et al.*, 2006). Eine Änderung der intrinsischen Aktivität konnte für den α_2 AR aktiviert mit Clonidin (Zunahme) und für den β 1AR aktiviert mit Isoproterenol und Adrenalin (Abnahme) gezeigt werden (Rinne *et al.*, 2013; Birk *et al.*, 2015). Indirekt konnte eine Änderung der intrinsischen Aktivität für den purinergen P₂Y₁ Rezeptor (P₂Y₁R), den M2AChR stimuliert mit Pilocarpin und den D2R gezeigt werden (Gurung *et al.*, 2008; Navarro-Polanco *et al.*, 2011; Sahlholm *et al.*, 2011). Bei dem P₂Y₁R kam es interessanterweise sogar in Anwesenheit eines neutralen Antagonisten durch Depolarisation zu einer Zunahme der intrinsischen Aktivität, indirekt gemessen als Rezeptor-induzierter Calciumspiegel (Gurung *et al.*, 2008).

Durch Mutationsstudien konnte für den M3AChR gezeigt werden, dass der Bindungsmodus für den Spannungseffekt ausschlaggebend war (Rinne *et al.*, 2015). So konnte hier durch Mutation einer einzelnen Aminosäure, einem Asparagin in Position 6.52, das zu einem Glutamin mutiert wurde, die Richtung der Spannungsabhängigkeit für den M3AChR, aktiviert mit Carbachol, geändert werden. Statt einer Deaktivierung durch Depolarisation konnte hier eine Aktivierung beobachtet werden. N^{6.52} ist eine konservierte Aminosäure unter den muskarinischen Rezeptoren. Trotzdem ließ sich die Beobachtung nur begrenzt auf andere muskarinische Rezeptoren übertragen. M1AChR N^{6.52}Q aktiviert mit Carbachol zeigte bei Depolarisation ein Verhalten, wie der Rezeptor-wt. M5AChR N^{6.52}Q aktiviert mit Carbachol zeigte interessanterweise keine messbare Spannungsabhängigkeit und somit eine deutliche Änderung gegenüber dem Rezeptor-wt (Rinne *et al.*, 2015). Neben der Tatsache, dass der exakte Ligandenbindungsmodus für die Spannungsabhängigkeit von GPCRs entscheidend sein kann, unterstreicht diese Untersuchung nochmals, dass die Spannungsabhängigkeit von GPCRs nicht vom gekoppelten G-Protein abhängt.

Wie in **Tabelle 3-1** zu erkennen ist, weisen bestimmte GPCRs, die nah miteinander verwandt sind, aktiviert mit dem gleichen Liganden, eine unterschiedliche Spannungsabhängigkeit auf. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden verschiedene Rezeptorchimären konstruiert. Durch den Austausch der ICL2 und ICL3 konnte für mGluR₁ und mGluR₃ eine Umkehrung des Spannungseffektes beobachtet werden (Ohana *et al.*, 2006). Hierfür war bei M1AChR und M2AChR sogar nur ein Austausch der ICL3 zusammen mit endständigen helicalen Sequenzen notwendig (Ben-Chaim *et al.*, 2006). In einer weiteren Arbeit wurden Chimären aus M1AChR und M3AChR konstruiert und auf geänderte Spannungsabhängigkeit hin untersucht. Hier wurden ECL2, ECL3 und TM7 als wesentlich für die Spannungsabhängigkeit identifiziert (Hoppe *et al.*, 2018). Die Modulation von muskarinischen Rezeptoren durch allosterische Modulatoren beruhte auf den gleichen Strukturen. Hierbei binden allosterische Modulatoren an die extrazellulär lokalisierte, allosterische Bindestelle. In der Folge kommt

es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Affinität zum Liganden und/oder die intrinsische Aktivität des orthosterischen Liganden verändert wird (Gregory *et al.*, 2007). Mutagenesestudien am M2AChR haben bereits demonstriert, dass die allosterische Bindestelle in die Kontrolle der spannungsabhängigen Agonistbindung involviert ist (Dekel *et al.*, 2012). Hier konnten Alanin Mutanten an W^{7.35}, das sich an der allosterischen Bindestelle befindet und für die Bindung allosterischer Modulatoren wesentlich ist (Prilla *et al.*, 2006) und W^{3.28}, lokalisiert an der Grenzfläche zwischen der allosterischen und der orthosterischen Bindestelle, die Spannungsabhängigkeit des M2AChR aktiviert mit ACh aufheben. Eine Alanin Mutation an W^{7.35} beim M3AChR führte ebenfalls zu einem Verlust der Spannungsabhängigkeit, wenn dieser mit ACh aktiviert war. Die Spannungsabhängigkeit von M3AChR aktiviert mit Pilocarpin war von dieser Mutation hingegen nicht beeinflusst (Hoppe *et al.*, 2018). Eine Mutation an W^{7.35} im M1AChR bewirkte weder eine Entkopplung von der allosterischen Bindestelle, noch eine Entkopplung von der Spannungsabhängigkeit (Hoppe, 2017). Die Autoren haben die unterschiedlichen Effekte dieser Mutation auf Unterschiede in der Kommunikation zwischen dem mutierten Tryptophan und den bei muskarinischen Rezeptoren vorhandenen Tyrosindeckel in der orthosterischen Bindestelle zurückgeführt (Hoppe *et al.*, 2018).

3.4.1 Spannungssensor für GPCRs

Für GPCRs gibt es kein anhand der Sequenz offensichtliches Cluster geladener Aminosäuren, analog zum S4 Segment spannungsabhängiger Ionenkanäle, das die Spannungsabhängigkeit vermitteln würde. Mit einem gemessenem z-Wert von 0,5 bis 1 e handelt es sich auch um eine verhältnismäßig kleine Ladungsverschiebung, sodass als Spannungssensor neben einer Bewegung geladener Aminosäuren, auch die Änderung eines Dipolmomentes, eine Verschiebung eines koordinierten Ions oder ein fluktuierendes Proton in Frage kämen. Da als Spannungssensor auch das konservierte Aspartat/Glutamat aus dem D(E)-R-Y Motiv in Frage käme, erfolgten hierzu bereits in der Vergangenheit Untersuchungen. Eine Mutation des Aspartats und des Arginins des D(E)-R-Y Motivs zu Asparagin führte am M2AChR zu einer verringerten *gating charge* und einer reduzierten spannungsabhängigen Radioligandenbindung (Ben-Chaim *et al.*, 2006). Dies konnte jedoch in nachfolgenden Studien nicht reproduziert werden. So zeigte die untersuchte M2AChR-Mutante *gating currents* (Navarro-Polanco *et al.*, 2011) und die Mutation der entsprechenden Aminosäuren am α_2A AR führte ebenfalls zu keiner Aufhebung der Spannungsempfindlichkeit (AG Bünemann, unveröffentlichte Daten). Auch ladungsneutralisierende Mutationen geladener Aminosäuren, die mit Teilen des D(E)-R-Y Motivs ionische Bindungen eingehen, führten weder am D2R (E6.30A) noch am Histamin-H3-Rezeptor (D6.30A) zu einer Beseitigung oder Veränderung der Spannungsabhängigkeit der Rezeptoren (Sahlholm *et al.*, 2012).

Zwei kürzlich erschienene Studien haben unterschiedliche Spannungssensoren für Klasse A GPCRs publiziert. Zu den wenigen geladenen konservierten Aminosäuren gehört D^{2.50}. Neben seiner Eigenschaft als geladene Aminosäure ist sie maßgeblich an der Koordination eines bei Klasse A GPCRs vorhandenen Natriumions beteiligt (Katritch *et al.*, 2014). Dieses unterhalb der orthosterischen Bindestelle befindliche Ion stabilisiert die inaktive Rezeptorkonformation. Vickery *et al.* beschreiben dieses Ion als den Spannungssensor für Klasse A GPCRs (Owen N. Vickery *et al.*, 2016). Dies wäre im Einklang mit der gemessenen *gating charge*. Außerdem befindet sich das Natriumion im TM-Bereich, der den Änderungen der Membranspannung am stärksten ausgesetzt ist. In MD-Simulationen beobachteten Vickery *et al.* für den M2AChR und den Delta-Opioid Rezeptor starke spannungsabhängige Bewegungen des Natriumions, das auch als Spannungssensor in Betracht käme. Experimentell ist die Position D^{2.50} insbesondere für den M2AChR bereits seit längerem im Zusammenhang mit der Spannungsabhängigkeit von GPCRs Gegenstand von Untersuchungen. So führt eine Alaninmutante an dieser Stelle dazu, dass keine *gating currents* mehr gemessen werden konnten (Navarro-Polanco *et al.*, 2011). Die Einordnung dieses Befundes war allerdings schwierig, da die Membranexpression dieses Konstruktes reduziert war. Für eine Asparaginmutante an dieser Stelle, deren Expression unverändert war, konnten ebenfalls keine *gating currents* gemessen werden. Die direkte Messung der spannungsabhängigen Affinitätsänderung und die Messungen der spannungsinduzierten Konformationsänderungen zeigten hingegen keinen Unterschied zum Rezeptorwt (Barchad-Avitzur *et al.*, 2016). D^{2.50} ist wesentlich für die Bindung des Natriumions. Eine Alanin Mutante an S^{3.39} am α_2 AR, das neben dem D^{2.50} ebenfalls wichtig für die Koordination des Natriumions ist, führte zu keiner wesentlichen Änderung der Spannungsabhängigkeit (Persönliche Kommunikation mit Prof. Bünemann), was ebenfalls gegen das Natriumion als Spannungssensor spricht. In einer weiteren Studie wurde der in der Gruppe der muskarinischen Rezeptoren konservierte Tyrosindeckel in der orthosterischen Bindestelle als Spannungssensor für den M2AChR identifiziert. Dieser Deckel besteht aus drei Tyrosinen. Tyrosin enthält ein Dipolmoment. Die *gating currents* waren vermindert für Mutationen, die das Dipolmoment reduziert haben. Die M2AChR Y^{3.33}A und Y^{3.33}F die den stärksten Effekt auf die Reduktion der *gating charge* hatten, konnten weder die Spannungsabhängigkeit, noch die Konformationsänderung vollständig aufheben. Auch eine Mutante, bei der alle drei Tyrosine zu Phenylalaninen mutiert wurden, konnte die Spannungsabhängigkeit nicht aufheben (Barchad-Avitzur *et al.*, 2016). Die Mutationen wurden am M3AChR wiederholt. Eine Mutante, die alle drei Tyrosine neutralisierte, konnte auch beim M3AChR die Spannungsabhängigkeit nicht aufheben (Hoppe *et al.*, 2018). Ein universeller Spannungssensor für GPCRs ist nach wie vor nicht gefunden und es ist unklar, ob ein solcher existiert.

Einleitung

GPCR	Depolarisation	Ligand	Beschrieben in
M1AChR	Aktiviert	ACh, CCh	Unter anderem in: (Ben-Chaim <i>et al.</i> , 2003, 2006)
M2AChR	Deaktiviert/ Aktiviert/ Kein Effekt	ACh, CCh/ Pilo/ Beth	Unter anderem in: (Ben-Chaim <i>et al.</i> , 2003, 2006; Moreno-Galindo <i>et al.</i> , 2016)
P ₂ Y ₁ R	Aktiviert	ATP	(Martinez-Pinna <i>et al.</i> , 2005)
mGluR ₁	Aktiviert	Glutamat	(Ohana <i>et al.</i> , 2006)
mGluR ₃	Aktiviert	Glutamat	(Ohana <i>et al.</i> , 2006)
D2R	Deaktiviert/ Kein Effekt	Dopamin, verschiedene Dopaminagonisten/ Apomorphin	(Sahlholm, Marcellino, <i>et al.</i> , 2008a; Sahlholm, Nilsson, <i>et al.</i> , 2008; Sahlholm <i>et al.</i> , 2011)
D3R	Kein Effekt	Dopamin	(Sahlholm, Marcellino, <i>et al.</i> , 2008b)
LPA1, LPA2	Aktiviert	LPA	(Martinez-Pinna <i>et al.</i> , 2010)
H3, H4	Deaktiviert	Histamin	(Sahlholm <i>et al.</i> , 2012)
α _{2A} AR	Deaktiviert	NE, Clonidin	(Rinne <i>et al.</i> , 2013)
PAR1, PAR4	Deaktiviert	N-Terminus / Agonist peptide	(Albarrán <i>et al.</i> , 2013)
M3AChR	Deaktiviert/ Aktiviert	ACh, CCh/ Pilo	(Rinne <i>et al.</i> , 2015; Hoppe <i>et al.</i> , 2018)
M5AChR	Deaktiviert	ACh, CCh	(Rinne <i>et al.</i> , 2015; Hoppe <i>et al.</i> , 2018)
β ₁ AR	Deaktiviert/ Aktiviert	Iso, Adr, NA/ DA	(Birk <i>et al.</i> , 2015)
β ₂ AR	Deaktiviert	Iso	(Birk <i>et al.</i> , 2015)
MOR	Aktiviert/ Deaktiviert/ Kein Effekt	Morphine/ Fentanyl/ Met-Enk	Persönliche Kommunikation mit Julia Ruland aus AG Bünemann
TP-Rezeptor	Aktiviert	U46619 und Analoga	(Martinez-Pinna <i>et al.</i> , 2005), Diese Arbeit
FP-Rezeptor	Aktiviert	U46619	Diese Arbeit
EP ₃ -Rezeptor	Aktiviert	Iloprost	Diese Arbeit
IP-Rezeptor	Kein Effekt	Iloprost	Diese Arbeit

Tabelle 3-1 Spannungsabhängigkeit von GPCRs Modulation der Rezeptoraktivität verschiedener Agonist-aktivierter GPCRs durch Membranspannung.

3.5 Ziel dieser Arbeit

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Gruppe der transmembranären Rezeptoren. Bereits seit 2003 ist bekannt, dass die Aktivität von durch Liganden-aktivierten GPCRs via Änderungen der Membranspannung moduliert werden kann. Diese Beobachtung wurde für Rezeptoren aus Klasse A und Klasse C gemacht und der Effekt wirkte sich auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion aus. Verschiedene Gruppen von GPCRs wurden auf ihre Spannungsabhängigkeit hin untersucht. Über die Spannungsabhängigkeit von Prostanoid-Rezeptoren war zu Beginn dieser Arbeit bis auf eine Untersuchung, die die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors streifte, nichts bekannt. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Spannungsabhängigkeit dieser Rezeptorgruppe in Bezug auf Ihre Spannungsabhängigkeit zu untersuchen. Dies ist von besonderem Interesse, da die endogenen Liganden der Prostanoid-Rezeptoren verhältnismäßig groß und lipophil sind und sich damit deutlich von den in dieser Hinsicht gut untersuchten Gruppen, wie aminergen und muskarinischen Rezeptoren unterscheiden.

Ein besonderer Fokus dieser Arbeit wurde auf die Erforschung der Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors gelegt. Für diesen gab es bereits Hinweise, dass Depolarisation endogene TP-Rezeptoren in Anwesenheit von einem Agonisten aktiviert. Diese Beobachtung erfolgte in Messungen von U46619-induzierten Ca^{2+} -Spiegeln in Megakaryozyten bei verschiedenen Haltepotentialen (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass der TP-Rezeptor Spannungsabhängigkeit in nativen Zellen zeigte, stellte einen wichtigen und sehr interessanten Befund dar. Gleichzeitig wies die durchgeführte Messung lediglich eine begrenzte Aussagekraft bezüglich des Spannungseffektes auf den TP-Rezeptor auf. So sind intrazelluläre Ca^{2+} -Signale aufgrund hoher Amplifikation des Signals, sowie der Abhängigkeit vom Füllungsgrad der Calciumspeicher und sekundärer Regulationsmechanismen nicht linear mit der Aktivität des TP-Rezeptors korrelierbar. Dies war für uns der Anlass unsere Untersuchung der Spannungsabhängigkeit am TP-Rezeptor starten zu lassen. Für die folgende Untersuchung wurden FRET-Messungen an einzelnen Zellen, als Maß für die Rezeptoraktivität, unter gleichzeitiger Kontrolle des V_M mittels *Patch-Clamp* durchgeführt. Durch einen FRET basierten TP-Rezeptor-Konformations-Sensor konnten direkte Effekte der Spannungsänderung auf die intrinsische Aktivität und Affinität, sowohl in Bezug auf ihre Qualität als auch ihre Quantität, untersucht werden. Die Weiterleitung des Spannungseffektes auf die nachgeschaltete Signalübertragung, konnte mit FRET-Assays untersucht werden, die die Interaktion von Rezeptor und G-Protein, G-Protein-Aktivierung oder G-Protein und Effektor (p115-RhoGEF) sichtbar machten.

Aufgrund des sehr großen experimentellen Aufwands wurden nicht alle Mitglieder der Prostanoid-Rezeptoren auf Spannungsabhängigkeit untersucht. Die Untersuchung sollte exemplarisch an sich unterscheidenden Vertretern durchgeführt werden: Neben dem TP-Rezeptor waren das: der FP-Rezeptor, der IP-Rezeptor und der EP₃-Rezeptor, die in dieser Studie zum ersten Mal überhaupt auf

Spannungsabhängigkeit der Rezeptor-Aktivität untersucht wurden. Über den Mechanismus hinter der beobachteten Spannungsabhängigkeit der Liganden-aktivierten GPCRs ist nicht viel bekannt und eine Spannungssensordomäne, wie beispielsweise bei spannungsabhängigen Ionenkanälen, wurde noch nicht gefunden. Die gemessene *gating charge* der Rezeptoren war sehr klein im Vergleich zu den spannungsabhängigen Ionenkanälen. Zu Beginn der Studie war weder ein Spannungssensor, noch der Mechanismus der Spannungsabhängigkeit publiziert. Deshalb sollte in dieser Studie der Mechanismus der Spannungsabhängigkeit von GPCRs am Beispiel des TP-Rezeptors untersucht werden. Hierzu sollte insbesondere eine Untersuchung der Rezeptor-Liganden-Interaktion mittels Mutationsstudien und Testung unterschiedlicher Liganden auf Spannungsabhängigkeit erfolgen. Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren ist in Kapitel 5 zu finden.

Ein in diesem Zusammenhang getesteter Ligand war das als TP-Rezeptor-Antagonist entwickelte Daltroban. Dieser Ligand verhielt sich in niedrigen Konzentrationen wie ein Antagonist und wurde erstaunlicherweise in hohen Konzentrationen zum Partialagonisten, der den TP-Rezeptor transient aktivierte. Aufgrund dieser unerwarteten Befunde erfolgte eine nähere Betrachtung der beobachteten Effekte in dieser Arbeit. Hierzu wurden die Daltroban-vermittelten Wirkungen auf den TP-Rezeptor und dessen Signaltransduktion auf unterschiedlichen Ebenen mit einer großen Bandbreite an verschiedenen FRET-Biosensoren untersucht. Da das beschriebene Phänomen völlig neu und der hierfür zugrundeliegende Mechanismus gänzlich unbekannt war, wurde auch dieser Gegenstand von in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. So wurde über die Testung von Daltroban-Derivaten versucht eine Struktur-Funktionsbeziehung zu ermitteln. Weiterhin wurden gezielt Rezeptor-Mutanten erstellt, um für die Daltroban-Effekte bedeutende Aminosäuren zu identifizieren. Die Untersuchungen im Kontext von Daltroban sind in Kapitel 6 zu finden.

Für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs sind FRET-basierte Konformations-Sensoren besonders geeignet, weil diese ohne eine Interaktion mit weiteren Proteinen die Rezeptoraktivität widerspiegeln und direkte Einblicke in die Qualität und Quantität des Spannungseffektes auf die GPCR-Aktivität geben können. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine schematische Herangehensweise zur Klonierung von Rezeptor-Sensoren entwickelt. Hierfür wurden die Erfahrungen vorangegangener Untersuchungen genutzt und eYFP in ICL3 und mTurquoise2 in den C-Terminus eingebracht. Die Positionen wurden hierbei analog zum TP-Rezeptor-Sensor gewählt. Die Entwicklung der GPCR-Rezeptor-Sensoren ist in Kapitel 7 zu finden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Software und Datenbanken

ApE -A plasmid Editor	M. Wayne Davis (University of Utah, Salt Lake City, USA)
BLAST	National Library of Medicine (Bethesda, USA) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)
Fluorescence Spectra Viewer	https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html
GPCRdb	https://gpcrdb.org/
GraphPad Prism 7 GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., (La Jolla, USA)
ImageJ 1.51f	Rasband W., NIH (Bethesda, USA) MFK
IUPHAR	www.guidetopharmacology.org
Mendeley Desktop	Mendeley, London, UK
Microsoft Office	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
NCBI Proteindatenbank	National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)
OriginPro 2016	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Patchmaster Software 2.65	HEKA Elektronik (Lambrecht, Deutschland)
Pubmed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
T _M -Rechner	https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html#/legacy=www.thermoscientificbio.com
SnapGeneViewer	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Borosilikatglaskapillaren GC 150 F-10	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Deckgläschen (25 mm)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen (6 ml)	Neolab, Heidelberg
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR, Darmstadt
Kulturröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturschalen (15 cm, 10 cm, 6 cm, beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (2 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht

Material und Methoden

Pipettenspitzen (1000 µl)	Gilson, Limburg-Offheim
Eppendorfgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well Zellkulturplatten (beschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Brand, Wertheim
Whatmanfilter (GE Healthcare)	VWR, Darmstadt

4.1.3 Chemikalien

Substanz	Lieferant
1 kB Leiter	New England BioLabs, Frankfurt
100 bp Leiter	New England BioLabs, Frankfurt
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar	Applichem, Darmstadt
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA), delipidiert	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Daltroban	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England BioLabs, Frankfurt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM (4,5g/L Glucose)	Biochrom, Berlin
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
Endothelin 1	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
FR900359 (G α_q -Inhibitor)	Freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Evi Kostenis, Universität Bonn, Deutschland
G-418 Sulfat	PAA, Pasching
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immersionsöl (Immersion 518F)	Zeiss, Jena
I-BOP	Biomol, Hamburg
Iloprost	Biomol, Hamburg
Isoprenalin	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
T4 Ligase	New England BioLabs, Frankfurt

L-Gutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific, Langenselbold
Pinan-Thromboxan A ₂	Biomol, Hamburg
Poly-L-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prostaglandin E ₂ Ethanolamid	Biomol, Hamburg
Prostaglandin E ₂ Methylester	Biomol, Hamburg
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
Ramatroban	Biomol, Hamburg
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Frankfurt
RNAseA	Roche, Mannheim
Salzsäure (37%)	Carl Roth, Karlsruhe
SQ 29,548	Biomol, Hamburg
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thrombin (Aus dem Novagen® kit)	Merck, Darmstadt
Trypsin/ EDTA (1:250)	Biochrom, Berlin
U46619	Biomol, Hamburg
8-iso Prostaglandin E ₁	Biomol, Hamburg
8-iso Prostaglandin E ₂	Biomol, Hamburg
15-keto Prostaglandin E ₂	Biomol, Hamburg
15(S)-15-methyl Prostaglandin E ₂	Biomol, Hamburg

4.1.4 Synthetisierte Halogenbenzsulfonamide

Folgende in dieser Studie verwendete Halogenbenzsulfonamide wurden von Lukas Heyder aus der Arbeitsgruppe von Prof. W.E. Diederich (Philipps-Universität, Marburg, Deutschland) synthetisiert. Die Strukturformeln der Liganden sind in *Abbildung 4-1* gezeigt. LHX445 lag zu ca. 80% als Natriumsalz und zu 20% als Dinatriumsalz vor.

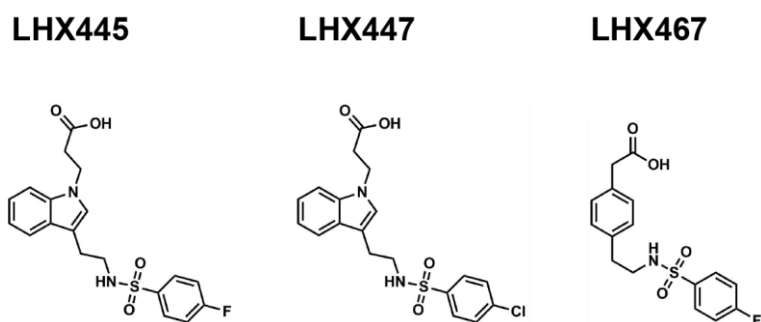


Abbildung 4-1 Synthetisierte Halogenbenzsulfonamide

4.1.5 Eukaryotische und prokaryotische Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien waren E. coli vom Stamm DH5 α . Folgende eukaryotische Zelllinien wurden verwendet: HEK293-, HEK293T- und HeLa-Zellen. Es handelt sich hierbei um adhärenz wachsende Zellen.

4.1.6 Plasmide

Plasmid	Spezies	Vektor	Referenz
G α_q	Maus	pcDNA3	(Hughes <i>et al.</i> , 2001)
G α_q -YFP	Maus	pcDNA3	(Hughes <i>et al.</i> , 2001)
G β_1	Mensch	pcDNA3	(Bünemann <i>et al.</i> , 2003)
Cer-G β_1	Mensch	pcDNA3	(Frank <i>et al.</i> , 2005)
G γ_2	Rind	pcDNA3	(Bünemann <i>et al.</i> , 2003)
mTurquoise2-G γ_2	Rind	N1-eCFP (Clontech)	Volker Jelinek in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Bünemann (persönliche Kommunikation)
GRK2	Mensch	pcDNA3	(Winstel <i>et al.</i> , 1996)
GRK2- mTurquoise2	Mensch	pcDNA3	(Wolters <i>et al.</i> , 2015)
pcDNA3		pcDNA3	Invitrogen
G α_{13} - mTurquoise2	Maus	pcDNA3	(Bodmann <i>et al.</i> , 2017)
ET _B -Rezeptor	Mensch	pcDNA3	Prof. Michael Schäfer, Universität Leipzig : Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
ET _B -Rezeptor–mTurquoise2 gekürzt	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
ET _B -Rezeptor–Sensor	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
EP ₃ -Rezeptor	Mensch	pcDNA3	Synthese durch Eurofins (Eurofins, Genomics Deutschland GmbH, Anzinger Str. 7a, 85560 Ebersberg) isoform 1, Genbank Code: L27490.1 optimiert für Homo sapiens codon usage table
EP ₃ -Rezeptor D124 ^{3.19} R	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
EP ₃ -Rezeptor-mTurquoise2 truncated	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
Epac1-cAMP Sensor	Mensch	pcDNA3	(Nikolaev <i>et al.</i> , 2004)
EP ₁ -Rezeptor	Mensch	pcDNA3.1	Missouri S&T cDNA Ressource Center (www.cdna.org),

Material und Methoden

			#PER0100000
FP-Rezeptor	Mensch	pcDNA3.1	Missouri S&T cDNA Ressource Center (www.cdna.org), #PTGFR00000
FP-Rezeptor-Sensor	Mensch	pcDNA3.1	Diese Arbeit
FP-Rezeptor-mTurquoise2 truncated	Mensch	pcDNA3.1	Diese Arbeit
TP-Rezeptor (α -Isoform)	Mensch	pcDNA3	(Bodmann <i>et al.</i> , 2017)
TP-Rezeptor F34 ^{1.42} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor T81 ^{2.57} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor D193 ^{5.36} E fw	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor D193 ^{5.36} E rv	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor S201 ^{5.44} T	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor L247 ^{6.37} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor S255 ^{6.45} T	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor W258 ^{6.48} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor W258 ^{6.48} L	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor R295 ^{7.40} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor R295 ^{7.40} K	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor T298 ^{7.43} A	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor T298 ^{7.43} N	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor W299 ^{7.44} L	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor-mTurquoise2	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
TP-Rezeptor-eYFP	Mensch	pcDNA3	(Krett, 2015)
TP-Rezeptor-Sensor	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
YFP-p115	Mensch	pcDNA3	(Krett, 2015)
mCherry-IP	Mensch	pcDNA3.1	Diese Arbeit
IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 in den C- Terminus eingefügt) Insertion zwischen G222 und S223	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 C-Terminal) Insertion zwischen G222 und S223	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 C-Terminal) Insertion zwischen G225 und P226	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
IP-Rezeptor	Mensch	pcDNA3.1	Missouri S&T cDNA Ressource Center (www.cdna.org),

Material und Methoden

			#PTGIR00000
IP-Rezeptor –eYFP	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
IP-Rezeptor–mTurquoise2	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
IP-Rezeptor–mTurquoise2 (im C-Terminus)	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
pBJ FLAGhPar1	Mensch	pBJ	Addgene (Plasmid #53226)
PAR1	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
PAR1-eYFP	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit
PAR1-Linker-eYFP	Mensch	pcDNA3	Diese Arbeit

4.1.6.1 Klonierungsstrategien

Die Klonierung der unterschiedlichen **TP-Rezeptor-Mutanten** erfolgte ausgehend von TP-Rezeptor-wt durch Mutagenese mit den in Abschnitt 4.1.7.1 aufgeführten Mutagenese-*Primern*. Der Ablauf einer Mutagenese ist in Abschnitt 4.2.2.15 näher beschrieben. Die Klonierung von **EP₃-Rezeptor D124^{3.19}R** erfolgte ebenfalls durch Mutagenese ausgehend von EP₃-Rezeptor-wt.

Die nachfolgend beschriebenen Klonierungen beinhalten Standard-Klonierungsverfahren, wie z.B.: Amplifikation von DNA mittels PCR, siehe Ablauf einer Standard-PCR in Abschnitt 4.2.2.14, Restriktionsverdau 4.2.2.9, Agarose Gelelektrophorese 4.2.2.10 Gelaufreinigung 4.2.2.12 und Ligation 4.2.2.11.

Die Klonierung von **mCherry-IP-Rezeptor** erfolgte durch N-terminales Einfügen von mCherry in einen IP-Rezeptor-pcDNA3-*Backbone* Vektor durch Nutzung der Restriktionschnittstellen BamHI und EcoRI. Die *Primer*, die genutzt wurden, um mcherry zu amplifizieren sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer zur Klonierung von mCherry-IP-Rezeptor*“ zu finden.

Die Klonierung von **PAR1 in pcDNA3** aus pBJ FLAGhPar1 erfolgte durch Einfügen von PAR-1 in einen pcDNA3-*Backbone* Vektor mittels Nutzung der Restriktionschnittstellen EcoRI und XhoI. Die *Primer*, die genutzt wurden, um PAR-1 aus pBJ FLAGhPar1 zu amplifizieren sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer für Klonierung von PAR-1 in pcDNA3*“ zu finden.

Die Klonierung von **PAR1-YFP** erfolgte durch N-terminales Einfügen von PAR-1 in einen eYFP-pcDNA3-*Backbone* Vektor durch Nutzung der Restriktionschnittstellen HindIII und BamHI. Die *Primer*, die genutzt wurden, um PAR-1 aus pBJ FLAGhPar1 zu amplifizieren sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer für Klonierung von PAR1-YFP*“ zu finden.

Die Klonierung von **PAR1-Linker-YFP** erfolgte durch N-terminales Einfügen von PAR1-Linker in einen eYFP-pcDNA3-*Backbone* Vektor durch Nutzung der Restriktionschnittstellen HindIII und BamHI. Die *Primer*, die genutzt wurden, um PAR-1 um einen Linker zu verlängern und aus PAR1-YFP

zu amplifizieren, sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer* für Klonierung von PAR-1-Linker-YFP“ zu finden.

Die Klonierung von **TP-Rezeptor-Sensor** erfolgte ausgehend von TP-Rezeptor-eYFP. Das eYFP am C-Terminus wurde mittels der Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI durch mTurquoise2 ersetzt. Die *Primer*, die genutzt wurden um mTurquoise2 zu amplifizieren sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer* für die Klonierung des TP-Rezeptor-Sensors“ im Unterabschnitt mTurquoise2 zu finden. Hierbei resultierte **TP-Rezeptor-mTurquoise2**. Anschließend wurde die BamHI Schnittstelle mittels einer Punktmutation deletiert (Siehe „*Mutagenese-Primer-Deletion*“). Der Ablauf einer Mutagenese ist in Abschnitt 4.2.2.15 näher beschrieben. Zwischen A232 und Q233 wurden über eine Mutagenese PCR eine BamHI und eine NheI Schnittstelle eingefügt (siehe „*Mutagenese-Primer-Insert sites*“). Mittels der eingefügten Schnittstellen zwischen A232 und Q233 wurde ein eYFP eingefügt. Die *Primer*, die genutzt wurden um eYFP zu amplifizieren sind im Abschnitt 4.1.7 unter „*Primer* für die Klonierung des TP-Rezeptor-Sensors“ im Unterabschnitt eYFP zu finden.

Die Klonierung von **IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 C-Terminal)** erfolgte durch N-terminales Einfügen von IP-Rezeptor, der von cDNA.org gekauft wurde, in einen mTurquoise2-pcDNA3-*Backbone* Vektor durch Nutzung der Restriktionsschnittstellen HindIII und BamHI. Es resultierte **IP-Rezeptor-mTurquoise2**. Die *Primer*, die genutzt wurden um IP-Rezeptor zu amplifizieren, sind im Abschnitt 4.1.7.7 unter „*Primer* zur Klonierung von IP-Rezeptor-mTurquoise2, 1.Schritt“ zu finden. Zwischen G222 und S223 wurden über eine Mutagenese PCR eine KpnI und eine EcoRI Schnittstelle eingefügt (Siehe „*Mutagenese-Primer-Insert sites*“, 2.Schritt). Mittels der eingefügten Schnittstellen wurde zwischen G222 und S223 ein eYFP eingefügt. Analog wurde in IP-Rezeptor-mTurquoise2 zwischen G225 und P226 ein eYFP eingefügt. Die *Primer*, die genutzt wurden, um eYFP zu amplifizieren, sind im Abschnitt 4.1.7.7 unter „*Primer* zur Klonierung von IP-Rezeptor-mTurquoise2, 3.Schritt“ zu finden.

Die folgenden Klonierungen von GPCR-Rezeptor-Sensoren beinhalten jeweils zwei Schritte, bei denen nacheinander Fluorophore in den entsprechenden Rezeptor eingefügt wurden. Die Klonierung erfolgte mittels *Gibson Assembly*. Die verwendeten *Primer* wurden jeweils im entsprechenden Abschnitt des folgenden Kapitels angegeben. Beim „Vektor“ handelt es sich um den Rezeptor und beim „Fragment“ um das einzufügende Fluorophor. Die Durchführung des *Gibson Assembly* wird in 4.2.2.16 näher beschrieben.

Die Klonierung von **IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 in den C-Terminus eingefügt)** erfolgte ebenfalls ausgehend vom ungelabelten IP-Rezeptor, der von cDNA.org gekauft wurde. mTurquoise2 wurde mittels *Gibson Assembly* in den C-Terminus des IP-Rezeptors zwischen A327 und S328 flankiert von AgeI und EcoRV inseriert. Es resultierte **IP-Rezeptor-mTurquoise2 (im C-Terminus)**. Ebenfalls

mittels *Gibson Assembly* wurde anschließend zwischen G222 und S223 eYFP flankiert von NotI und SacII eingefügt.

Für die begonnene Klonierung eines EP₃-Rezeptor-Sensors diente als Ausgangsplasmid der ungelabelte EP₃-Rezeptor, synthetisiert von Eurofins (Eurofins Genomics). Mittels *Gibson Assembly* wurde der C-Terminus des EP₃-Rezeptors nach S379 abgeschnitten und dahinter mTurquoise2 flankiert von AgeI und EcoRV eingefügt. Es resultierte **EP₃-Rezeptor-mTurquoise2 truncated**.

Die Klonierung von **FP-Rezeptor-Sensor** erfolgte ausgehend von einem ungelabelten FP-Rezeptor, der von cDNA.org gekauft wurde. Mittels *Gibson Assembly* wurde der C-Terminus des FP-Rezeptors nach K339 abgeschnitten und dahinter mTurquoise2 flankiert von AgeI und EcoRV eingefügt. Es resultierte **FP-Rezeptor-mTurquoise2 truncated**. Als Nächstes wurde eYFP in die ICL3 flankiert von NotI und SacII zwischen Q239 und G240 ebenfalls mittels Gibson-Assembly eingefügt.

Für die Klonierung des **ET_B-Rezeptor-Sensors** diente als Ausgangsplasmid der ungelabelte ET_B-Rezeptor, der uns freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Schäfer aus Leipzig zur Verfügung gestellt wurde. Mittels *Gibson Assembly* wurde der C-Terminus des ET_B-Rezeptors nach L421 abgeschnitten und dahinter mTurquoise2 eingefügt. Es resultierte **ET_B-Rezeptor-mTurquoise2 truncated**. Als Nächstes wurde eYFP in die ICL3 flankiert von NotI und SacII zwischen I309 und S310 eingefügt.

4.1.7 Verwendete Oligos

Alle nachfolgend gelisteten *Primer*-Sequenzen wurden von 5' nach 3' angegeben.

4.1.7.1 Verwendete Mutagenese-Primer:

Klonierung	Primer-Sequenz (von 5' nach 3')
EP ₃ -Rezeptor D124 ^{3.19} R	AGATGGGAGCACATCCGCCCCAGCGGCAGACTG
TP-Rezeptor F34 ^{1.42} A	TGGTTCGCCGCCTCCGCTTGCGTGGTGGGCCT
TP-Rezeptor T81 ^{2.57} A	CTGGGGCTGCTGGTGCCGGTACCATCGTGGTG
TP-Rezeptor D193 ^{5.36} E fw	GGCGCCGAGTCCGGGGAAGTGGCCTTCGGGCTG
TP-Rezeptor D193 ^{5.36} E rv	CAGCCCGAAGGCCACTTCCCCGGACTCGGCGCC
TP-Rezeptor S201 ^{5.44} T	TTCGGGCTGCTCTTCACCATGCTGGGCGGCCTC
TP-Rezeptor L247 ^{6.37} A	GAGATGATGGCTCAGGCCCTGGGGATCATGGT
TP-Rezeptor S255 ^{6.45} T	GATCATGGTGGTGGCCACCGTGTGTTGGCTGCCC
TP-Rezeptor W258 ^{6.48} A	GTGGCCAGCGTGTGTGCGCTGCCCTTCTGGTC
TP-Rezeptor W258 ^{6.48} L	TGGCCAGCGTGTGTTTGCTGCCCTTCTGGT
TP-Rezeptor R295 ^{7.40} K	GCTGCTCATCTACTTGAAAGTGGCCACCTGGAACC
TP-Rezeptor R295 ^{7.40} A	AGGAGCTGCTCATCTACTTGGCTGTGGCCACCTGGAACCAGAT
TP-Rezeptor T298 ^{7.43} A	TACTTGCGCGTGGCCGCTGGAACCAGATCCTG
TP-Rezeptor T298 ^{7.43} N	ACTTGCGCGTGGCCAACTGGAACCAGATCCT
TP-Rezeptor W299 ^{7.44} L	TTGCGCGTGGCCACCTTGAACCAGATCCTGGAC

Material und Methoden

In den folgenden Tabellen wurde jeweils links das *Template* bzw. eine Erläuterung zu den *Primern* und rechts die verwendeten *Primer* angegeben. Die *Primer*-Sequenz wurde von 5' nach 3' angegeben.

4.1.7.2 *Primer* zur Klonierung von mCherry-IP-Rezeptor

mCherry	Fw: AAAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG Rv: AAAAAAGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
---------	---

4.1.7.3 *Primer* zur Klonierung von PAR1 in pcDNA3

PAR1	Fw: AAAAAAGAATTCATGGACAGCAAAGGTTTCGTCTG Rv: AAAAAACTCGAGCTAAGTCAACAGCTTTTTGTATAT
------	---

4.1.7.4 *Primer* zur Klonierung von PAR1-YFP

PAR1	Fw: AAAAAAAGCTTATGGACAGCAAAGGTTTCGTCTG Rv: AAAAAAGGATCCAGTCAACAGCTTTTTGTATAT
------	---

4.1.7.5 *Primer* zur Klonierung von PAR1-Linker-YFP

PAR1	Fw: AAAAAAAGCTTATGTGGCCCAACGG Rv: ACGCCGCGCGGGTCTCGGTCGCCCGCGCGCCTGGCGCTGGCCGCG GTGGCCGCGGTGGCCTTGGCCGTGGCGCTGCTGCCGCTGGCGCGCGTG GGCCGCTATGAGCTGCAGTACCCGGGCACGTGGTGCTTCATCGGCCTGG GTCCCCCGGGCGGCTGGCGCCAGGCACTGCTTGCTGGCCTCTTCGCCA GCCTCGGCCTGGTCGCGCTCC
------	---

4.1.7.6 *Primer* zur Klonierung von TP-Rezeptor-Sensor

mTurquoise2	Fw: AAAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG Rv: AAAAAACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
Mutagenese- Primer-Deletion	CTCCGGGCTGCAGGGG <u>T</u> CCATGGTGAGCAAG
Mutagenese- Primer-Insert-sites	GGGCAGGAGGCGGCCGGATCCGGGGGGGCTAGCCAGCAGCG TCCCCGG
eYFP	Fw: AAAAAAGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG Rv: AAAAAA GCT AGC CTTGTA CAG CTC GTCCAT GC

4.1.7.7 *Primer zur Klonierung von IP-Rezeptor-Sensor (C-Terminal):*

1. Schritt

IP-Rezeptor	Fw: AAAAAAAGCTTATGGCGGATTCGTGCAGGAACCTCACC Rv: TTTTTTGGATCCGCCAGCGTCGCCTGCTCCCTCTGC
-------------	--

2. Schritt

IP G222 S223 <i>Insert sites</i>	AAGCGCCACCAGGGCGGTACCGGGGGGGAATTCTCTCTGGG TCCACGG
IP G225 P226 <i>Insert sites</i>	CAGGGCTCTCTGGGTGGTACCGGGGGGGAATTCCCACGGCC GCGCACC

3. Schritt

eYFP	Fw: AAAAAAGGTACCATGGTGAGCAAGGGCGAG Rv: AAAAAAGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
------	--

4.1.7.8 *Primer zur Klonierung von IP-Rezeptor-Sensor (mTurquoise2 in den C-Terminus eingefügt):*

1. Schritt *Primer für Klonierung von IP-Rezeptor-mTurquoise2 (in den C-Terminus eingefügt)*

Vektor fw <i>Primer</i>	CACACCGGTCCCTGAGGCGAGCTGG
Vektor rv <i>Primer</i>	CTGTACAAGGATATCAGGAGGGACCCAAGGGC
mTurquoise2 fw <i>Primer</i>	GGGACCGGTGTGAGCAAGGGCGAGGA
mTurquoise2 rv <i>Primer</i>	TCCTGATATCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

2. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	CAAGCCGCGGTCTCTGGGTCCACGGCC
Vektor rv <i>Primer</i>	CATAGCGGCCGCGCCCTGGTGGCGCTTC
eYFP fw <i>Primer</i>	GCGGCCGCTATGGTGAGCAAGGGCGAG
eYFP rv <i>Primer</i>	GACCGCGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

4.1.7.9 *Primer für begonnene Klonierung von EP₃-Rezeptor-Sensor*

1. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	AAGGATATCTAATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCAC
Vektor rv <i>Primer</i>	CTCACACCGGTGCTGCACTGGCAGGGC
mTurquoise2 fw <i>Primer</i>	GCACCGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mTurquoise2 rv <i>Primer</i>	CCCTCTAGATTAGATATCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

Material und Methoden

2. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	GTACAAGCCGCGGCAGAGCAGCGCCCAGTG
Vektor rv <i>Primer</i>	CATAGCGGCCGCGCTGGCGGTGGCCTTG
eYFP fw <i>Primer</i>	GCGGCCGCTATGGTGAGCAAGGGCGAG
eYFP rv <i>Primer</i>	CCGCGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG

4.1.7.10 *Primer zur Klonierung von FP-Rezeptor-Sensor*

1. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	TACAAGGATATCTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCC
Vektor rv <i>Primer</i>	ACACCGGTTTTAATGGAATAAGCTCCCAAATATGTAAGCT
mTurquoise2 fw <i>Primer</i>	TCCATTAAAACCGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mTurquoise2 rv <i>Primer</i>	CGAGCTAGATATCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

2. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	AAGTTACCGCGGGGCAGATCTCATCATTTGGAAATGGT
Vektor rv <i>Primer</i>	TAGCGGCCGCTTGTCTGTGCTGCTGACTTTTAAATTT
eYFP fw <i>Primer</i>	AAGCGGCCGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
eYFP rv <i>Primer</i>	CCCGCGGTAACCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

4.1.7.11 *Primer zur Klonierung von ET_B-Rezeptor-Sensor*

1. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	TGTACAAGTGAAAGAGGATCCTCTAGAGGGCC
Vektor rv <i>Primer</i>	GCTCACTAAGCACGACTGCTTTTCCTCCAA
mTurquoise2 fw <i>Primer</i>	TCGTGCTTAGTGAGCAAGGGCGAGGAG
mTurquoise2 rv <i>Primer</i>	GATCCTCTTTCACCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

2. Schritt

Vektor fw <i>Primer</i>	CCGCGGGCTTTAAATGATCACCTAAAGCAGAGACG
Vektor rv <i>Primer</i>	AGCGGCCGCTAAAATCTGCATGCCACTTTTCTTTCTCA
eYFP fw <i>Primer</i>	TTTAGCGGCCGCTATGGTGAGCAAGGGCGAG
eYFP rv <i>Primer</i>	TTTAAAGCCCGCGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC

4.1.8 Verwendete Kits

Effectene® Transfection Reagent	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Gibson Assembly Kit	New England BioLabs, Frankfurt
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

4.1.9 Verwendete Geräte

4.1.9.1 Verwendete Geräte allgemein

2.0 mm <i>square box filament</i> , 2.0 mm <i>wide</i>	Science Products GmbH, Hofheim am Taunus
Accu-jet pro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Attofluor	Invitrogen, Darmstadt
Dichrotischer Strahlenteiler DCLP 460	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Dichrotischer Strahlenteiler DCLP 515	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Dual-Emissions Photometrie System	TILL Photonics, Gräfelfing Übernommen von Thermo Scientific, Waltham, USA
Druckluftgefederter Messtisch, Air-cushioned optical table	Newport Corp., Stahnsdorf
Eismaschine Ice flaker F100 Compact Incubator	Icematic, Düsseldorf
Emissionsfilter CFP D480/40M	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Emissionsfilter YFP HQ535/30M	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Exzitationsfilter ET 436/20x	Chroma Technology, Bellows Falls, USA
Feinwaage 770 (precision balance)	KERN & Sohn, Balingen-Frommern
FiveEasy pH Meter	Mettler Toledo, Gießen
Gefrierschrank (-80°C) FORMA 900 Series	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Hitzesterilisationsofen Heraeus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 16R Zentrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Horizontalel Schüttler 3015	GFL, Burgwedel
Inkubator APT.lineTM C150	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank Profiline	Liebherr, Biberach a. d. Riss
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrowelle R-202	SHARP Electronics, Hamburg
Mikromanipulator MMJ	Märzhäuser, Wetzlar
Mikromanipulator MHW	Narishige, London, UK
Nanophotometer	Implen, München
Sterile Werkbank Esco ac2-4e8-tu sentinel gold	Esco Technologies, Inc., Hatboro, USA
Sterile Werkbank LabGard ES NU 437-400E Klasse II	NuAire, Plymouth, USA
Pipette Gilson Pipetman	Gilson, Limburg-Offheim
Puller P-87	Sutter Instruments, Navato, USA
Mikroskop Axiovert 130 (invertiert)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Xenonlampe Polychrome V	TILL Photonics, Gräfelfing

	Übernommen von Thermo Scientific, Waltham, USA
Perfusionssystem ALA VC3-8SP	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, USA
<i>Thermocycler</i>	SensoQuest, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vertikaler Standautoklav VX-95	Systec GmbH, Linden
Vortex – Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Verstärker EPC 10	HEKA Elektronik (Lambrecht, Deutschland)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einem LAF unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die für Zellkulturarbeit notwendigen Zentrifugationsschritten erfolgten ausschließlich mit einer Heraeus Megafuge 11R Zentrifuge.

4.2.1.1 Kultivierung von HEK293- und HeLa-Zellen

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit transient oder stabil transfizierten HEK293 (*Human embryonic kidney cells*) oder HeLa Zellen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, 4,5 g/l D-Glucose) verwendet. Dieses Medium wurde supplementiert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin. Für stabil transfizierte Zelllinien wurde zu dem Medium das Selektionsantibiotikum G418 (1 mg/mL) hinzugegeben. Die Zellen wurden auf 10 cm Zellkulturschalen gehalten und zweimal pro Woche gesplittet (Passage erhöht). Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen von den Zellkulturschalen wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und mit Trypsin / EDTA (0,05 / 0,02% in Dulbecco-PBS ohne Mg²⁺ / Ca²⁺) bei 37°C inkubiert. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von neuem Medium gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert und in ein Falcon überführt. Durch zwei-minütige Zentrifugation bei 500 U / min bildete sich ein Zellpellet das vom Überstand befreit wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit Medium resuspendiert und in einer adäquaten Dichte auf 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

4.2.1.2 Transfektion von HEK293 und HeLa Zellen

Transfektion bezeichnet die Einbringung von DNA in eukaryotische Zellen. Wird die DNA als Plasmid ins Zytosol aufgenommen spricht man von einer transienten Transfektion. Die Zellen verlieren die DNA während der Mitose. Dies geschieht bei der Mehrzahl der Zellen. Wird die DNA stabil ins Genom

eingebaut spricht man von einer stabilen Transfektion, dies geschieht bei einer Transfektion nur in einem sehr geringeren Teil der Zellen. Transfektionen wurden in dieser Studie mit dem Effectene Kit von Qiagen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% wachsen lassen. Die dem zu transfizierenden Assay entsprechend DNA Menge und Zusammensetzung wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert, siehe Abschnitt 4.2.1.3. Anschließend wurden 150 µl EC Puffer und 16 µl Enhancer hinzugegeben, gevortext und 3 Minuten inkubiert. Dann wurden 20 µl Effectene hinzugegeben, gevortext und 7 Minuten inkubiert. Auf das Transfektionsgemisch wurde überstehendes Medium der zu transfizierenden Zellen pipettiert und die resultierende Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben.

4.2.1.3 Transfektionsprotokolle

Transfektionen in HEK293T Zellen:

Assay	Menge cDNA [µg]
GPCR-Sensor-Assay	GPCR-Rezeptor-Sensor, 1
TP-Rezeptor induzierte $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion	TP-Rezeptor-wt oder -Mutante, 0,5 $G\alpha_{13}$ -mTur2, 0,8 $G\beta_1$ -wt, 0,5 $G\gamma_2$ -wt, 0,2 YFP-p115, 1
FP-Rezeptor induzierte $G\alpha_q$ -Aktivierung	FP-Rezeptor, 0,5 (Für Negativkontrolle ersetzt durch leeren pcDNA3) $G\alpha_q$ -YFP, 1,5 $G\beta_1$ -Cer, 0,5 $G\gamma_2$ -wt, 0,2
IP-Rezeptor cAMP Messungen	mCherryIP-Rezeptor, 0,5 Epac1-cAMP Sensor, 1
β_2 AR cAMP Messungen und IP-Rezeptor Negativkontrolle	Epac1-cAMP Sensor, 1
TP-Rezeptor cAMP Messungen	TP-Rezeptor-wt, 0,5 Epac1-cAMP Sensor, 1
EP ₃ -Rezeptor GIRK Messungen	EP ₃ -Rezeptor-wt oder Mutante-D124R, 0,3 pcDNA3-CFP, 0,2 Bizistronisches Plasmid mit Untereinheiten GIRK1 and GIRK4, 0,5
TP-Rezeptor $G\alpha_q$ -Aktivierung Interaktion von $G\alpha_q$ und $G\beta$	TP-Rezeptor-wt, 0,5 $G\alpha_q$ -YFP, 1,5 $G\beta_1$ -Cer, 0,5

Material und Methoden

Verwendet in: Abschnitt 5	G γ_2 -wt, 0,2 GRK2, 0,5
TP-Rezeptor G α_q -Aktivierung Interaktion von G α_q und G γ Verwendet in: Abschnitt 5.2.1	TP-Rezeptor-wt, 0,5 G α_q -YFP, 1,5 G β_1 -wt, 0,5 G γ_2 -mTurquoise2, 0,2 GRK2, 0,5
PAR1 G α_{13} -p115-Interaktion	PAR1, 0,5 G α_{13} -mTur2, 0,8 G β_1 -wt, 0,5 G γ_2 -wt, 0,2 YFP-p115, 1

Die Transfektion in HeLa-Zellen für die TP-Rezeptor induzierte G α_{13} -p115-Interaktion wurde analog zur Transfektion in HEK293T-Zellen durchgeführt.

Transfektionen in HEK293-Zellen, die stabil TP-Rezeptor-eYFP exprimieren:

Assay	Menge cDNA [μ g]
TP-Rezeptor-G α_{13} -Interaktion	G α_{13} -mTur2 ,0,8 G β_1 -wt, 0,5 G γ_2 -wt, 0,2
TP-Rezeptor-GRK2-Interaktion	G α_q -wt,0,8 G β_1 -wt, 0,5 G γ_2 -wt, 0,2 GRK2-mTur2, 0,5

4.2.1.4 Aussähen der transfizierten Zellen auf PLL beschichtete Deckgläschen

Am darauffolgenden Tag wurden die transfizierten Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Hierzu wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, mit Trypsin abgelöst, gereinigt, resuspendiert und auf Deckgläschen ausgesät. Diese befanden sich in 6-Lochplatten und waren zuvor mit PLL beschichtet worden. Die Beschichtung mit PLL erfolgte, indem jeweils ein Tropfen Poly-L-Lysinhydrobromid-Lösung auf die Deckgläschen aufgebracht und mindestens 30 Minuten inkubiert wurde. Im Anschluss wurde das PLL abgesaugt und die Deckgläschen mit PBS gewaschen. Diese nicht sterilen Deckgläschen waren zuvor in Ethanol (70% v/v) gehalten und im Anschluss mit PBS gewaschen worden. Die Messung der Zellen erfolgte am zweiten Tag nach der Transfektion.

4.2.1.5 Auftauen von Zellen

Zellen, die zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren waren, wurden rasch aufgetaut. Hierzu wurde zuvor in einem Falcon 10 ml Nährmedium auf 37°C erwärmt. Von diesem Medium wurde 1 ml auf die gefrorenen Zellen und im Anschluss wieder zu dem erwärmten Nährmedium im Falcon pipettiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die Zellen vollständig aufgetaut und in das Falcon überführt worden waren. Direkt im Anschluss wurden die im Falcon befindlichen Zellen zentrifugiert (500 U / min, 2 min) und vom Überstand befreit. Die Zellen wurden mit Auftaunährmedium resuspendiert und in auf eine 10 cm Schale ausgesät. Das Auftaunährmedium entsprach dem zur Kultivierung verwendeten Nährmedium enthielt aber 20 statt 10 % FCS. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und das zur Kultivierung verwendete Medium mit Zusatz von G418 (1 mg/mL) verwendet.

4.2.1.6 Einfrieren von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-80% durch Trypsinierung abgelöst, anschließend in Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet mit 2ml Einfriermedium (DMEM mit 20%FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Nachfolgend wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen aliquotiert und die Kryoröhrchen in eine Einfrierboxe (CoolCell®, Biocision) gestellt, die über Nacht im Gefrierschrank bei -80°C platziert wurde. Die Zellen kühlten langsam um 1 Grad °C pro Minute auf die Außentemperatur ab. Die auf -80°C abgekühlten Zellen wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingelagert.

4.2.1.7 Generierung stabiler Zelllinien

Um stabile Zelllinien zu generieren, wurden HEK293-Zellen mit dem gewünschten Konstrukt in einer 6 cm Schale transfiziert (wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben). Nach 24 Stunden wurden ca. 1% der transfizierten Zellen auf eine 15 cm Zellkulturschale, auf der 20 ml Zellkulturmedium mit G418 Zusatz vorgelegt waren, ausgesät. Auf dieser lagen die meisten Zellen vereinzelt vor. Bis zum Heranwachsen ausreichend großer Zellhaufen wurde zweimal in der Woche 10 ml Medium entnommen und mit 10 ml frischen Medium ersetzt. Sobald die Zellhaufen groß genug waren, dass sie mit dem bloßen Auge sichtbar waren, wurden sie „gepickt“: Hierzu wurde bei einer Mikropipette ein Volumen von 100 µl eingestellt eine Spitze aufgesteckt und mit dieser der zu pickenden Klon aufgezo-gen. Die einzelnen Klone wurden in 24 Loch Platten überführt und dort wachsen gelassen. Bei entsprechender Dichte wurden die Zellen durch Scherstress abgelöst und auf ein größeres Format umgesetzt. Ein kleiner Teil der Zellen wurde auf Deckglässchen ausgesät, um Fluoreszenzbilder aufzunehmen und anhand derer zu

entscheiden welche Klone den Anforderungen bezüglich Lokalisation und Intensität des entsprechenden Konstruktes entsprachen. In einem weiteren Schritt wurden mit diesen Zellen FRET Messungen durchgeführt, um deren Eignung für weitere Untersuchungen festzustellen. Die Klone, die den Anforderungen entsprachen wurden weiterwachsen gelassen und auf größere Formate bis hin zur 10 cm Schale umgesetzt. Die restlichen Klone wurden verworfen. Ab der 6 cm Schale erfolgte das Ablösen der Zellen durch Trypsinierung wie in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben. Von den ausgewählten Klonen wurden mehrere Kryoröhrchen mit Zellen weggefroren siehe Abschnitt 4.2.1.6.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung von E. coli

E. coli vom Stamm DH5 α wurden in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert. E. coli in LB-Medium wurden zusätzlich auf einen Schüttler gestellt. LB Medium und LB Agarplatten wurden zuvor im Labor hergestellt. Zur Herstellung des flüssigen Nährmediums wurde LB-Medium-Pulver nach Lennox (AppliChem) in der Konzentration 20 g/l in Reinstwasser gelöst, in Flaschen abgefüllt und autoklaviert. Für die Gießmasse von Agarplatten wurden 250 ml LB Medium und 3,75 g Agar in eine 500 mL Flasche zusammengegeben und autoklaviert. Die Agargießmasse wurde zum Gießen der Platten in der Mikrowelle erhitzt bis sie komplett flüssig und klar war. Die Gießmasse wurde gerührt und bis auf Handwärme abgekühlt. Für antibiotikahaltige Platten wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt, in dieser Arbeit entweder Ampicillin (Endkonzentration 0,1 mg/L) oder Kanamycin (Endkonzentration 0,03 mg/L). Anschließend wurden mit der verflüssigten Gießmasse Platten in Petrischalen gegossen. Diese wurden über Nacht zum Aushärten stehen gelassen und anschließend bei 4°C gelagert.

4.2.2.2 Generierung kompetenter Bakterien

Die Vorgehensweise zur Generierung kompetenter Bakterien basierte auf (Chung *et al.*, 1989). Bereits chemisch kompetente E. coli wurden auf LB-Agarplatten ohne Selektionsantibiotikum durch Ausplattieren vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine Vorkultur wurden 10 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte angeimpft. Das angeimpfte Medium wurde über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Zu 250 ml LB-Medium wurden 5-10 ml der Vorkultur hinzugegeben. Das angeimpfte Medium wurde bei 37 °C auf dem Schüttler bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,3-0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (4°C, 10 min, 5000 rpm, Megafuge 16R). Das erhaltene Pellet wurde in 25 ml TSB (*Transformation and storage buffer*)- Puffer (10% (m/V) PEG 3000, 5% (V/V) DMSO, 20 mM MgCl₂ oder MgSO₄ in LB-Medium) resuspendiert und aliquotiert. Nach einer ein- bis

zweistündigen Inkubation der Aliquots auf Eis wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

4.2.2.3 Transformation kompetenter E. coli mittels KCM-Methode

Zu einem Ansatz aus 20 µl KCM-Puffer 5x (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂) und 80 µl Reinstwasser und der zu transformierenden DNA (5 µl aus dem Ligationsansatz, oder 0,1-0,2 µg Plasmid-DNA) wurden 100 µl auf Eis aufgetaute kompetente E. coli hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 1 ml LB-Medium. Der Transformationsansatz wurde für 50 Minuten bei 37°C im Heizblock (Thermomix) geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 13300 rpm Zentrifuge (Heraeus Fresco 17) eine Minute zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in dem nicht abschüttbaren Überstand (ca. 100 µl LB-Medium) resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte mit dem für das zu amplifizierende Plasmid entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2.4 Transformation kompetenter E. coli mittels Hitzeschock

Transformationen von NEB® 5-alpha kompetenten E. coli (Hohe Transformationseffizienz) wurden nach den Vorgaben des Herstellers mittels Hitzeschock durchgeführt. Zunächst wurden die Bakterien 10 Minuten lang auf Eis aufgetaut. Zu 3 µl Mutageneseansatz wurden 15-25 µl kompetente E. coli pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis gestellt. Als Nächstes wurde der eigentliche Hitzeschock durchgeführt: Die Bakterien wurden für genau 30 Sekunden bei 42°C inkubiert und direkt im Anschluss für fünf Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden 285-475 µl SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) Medium hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 50 Minuten bei 37°C im Heizblock (Thermomix) geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 13300 rpm in einer Zentrifuge eine Minute zentrifugiert (Heraeus Fresco 17). Das erhaltene Pellet wurde in dem nicht abschüttbaren Überstand (ca. 100 µl LB-Medium) resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte mit dem für das zu amplifizierende Plasmid entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2.5 DNA Präparationen

Sowohl die Mini- als auch die Midipräparation basieren auf der alkalischen Lysemethode (Birnboim and Doly, 1979).

4.2.2.6 Minipräparation

Zur Aufreinigung geringer DNA-Mengen erfolgte eine Minipräparation (Plasmidpräparation im kleinen Maßstab). Hierzu wurden 4 ml Selektionsantibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer Kolonie transformierter E. coli angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 13300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Fresco 17). Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet wurde in 100 µl Lösung 1, siehe *Tabelle 4-1*, nach Zusatz von 2 µl RNase A (10 mg/mL) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung 2, siehe *Tabelle 4-1*, und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurde die alkalische Lyse durchgeführt. Durch Zugabe von 150 µl Puffer 3, siehe *Tabelle 4-1*, wurde der Ansatz neutralisiert und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 13300 rpm und 4 °C für 10 Minuten (Heraeus Fresco 17). Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in das zuvor 450 µl gekühltes Isopropanol vorgelegt wurde. Dadurch wurde die Plasmid DNA gefällt. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA bei 13300 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert (Heraeus Fresco 17). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde mit 450 µl 70%-igem (V/V) Ethanol gewaschen und bei 13300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Fresco 17). Nach Entfernen des Überstandes wurde die pelletierte Plasmid-DNA getrocknet und anschließend in 30 µl Reinstwasser gelöst.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3
50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris(base) in Reinstwasser pH 8,0	0,2 M NaOH 1% SDS in Reinstwasser	60 ml Kaliumacetat (5 M) 11,5 ml konz. Essigsäure 96% 28,5 ml in Reinstwasser

Tabelle 4-1 Für Minipräparation hergestellte Lösungen

4.2.2.7 Midipräparation

Für die Isolation und Aufreinigung mittlerer Plasmid-DNA Mengen (ca. 100 µg), wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. 100 ml LB Medium wurden mit transformierten E. coli angeimpft, der Resistenz entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Diese Bakterien-Vorkultur wurden durch 8-minütige Zentrifugation (4500 rpm, 4°C, Heraeus Megafuge 16R) pelletiert. In 4 ml Puffer 1 wurde das resultierende Pellet resuspendiert. Im Anschluss wurden 4 ml Puffer 2 hinzugegeben und bis zum Auftreten einer Blaufärbung leicht geschüttelt. Nach 4-minütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml Puffer 3 (Neutralisationspuffer) hinzugegeben und leicht geschüttelt bis die Blaufärbung verschwand. Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 5000 rpm, 4°C, Heraeus Megafuge 16R) und der Überstand auf die im Kit enthaltenen, zuvor mit QBT Puffer equilibrierte, Anionenaustauscher-Säulen gegeben. Die an der Säule anhaftende Plasmid-DNA wurde zweimal mit 10 mL Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit 5ml Elutionspuffer in ein

Kulturröhrchen mit 3,5 ml vorgekühltem Isopropanol 100% (V/V) eluiert. Die in Isopropanol unlösliche Plasmid DNA fiel aus und wurde bei 5000 rpm und 4 °C für mindestens 10 min abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R). Das Plasmid-DNA Pellet wurde mit 2 ml 70%igem (V/V) EtOH gewaschen, für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 16R), getrocknet und abschließend typischerweise in 100 µl autoklaviertem Reinstwasser gelöst.

4.2.2.8 Messung von DNA-Konzentrationen und –Reinheit

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Nano Photometers (NanoDrop Implen). Da alle Plasmide in Wasser gelöst waren, wurde Wasser als Referenz gemessen. Um die Konzentration und Reinheit zu bestimmen erfolgte die Messung der optischen Dichte der Plasmidlösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm (Konzentration DNA) bzw. bei 320 nm (Konzentration Proteine), relativ zur Absorption von Reinstwasser. Die DNA wurde als ausreichend rein betrachtet, wenn der ermittelte Quotient von Absorption bei 260 nm / Absorption bei 320 nm Werte $\geq 1,8$ ergab. Alle Plasmide wurden, nach Möglichkeit, mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

4.2.2.9 Restriktionsverdau

DNA Verdau mit Restriktionsenzymen wurde ein Verdauansatz (typischer Verdauansatz siehe Tabelle) für mindestens eine Stunde bei dem Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach abgeschlossenem Restriktionsverdau wurden die DNA-Schnittstücke gelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand ihrer Größe identifiziert und gegebenenfalls ausgeschnitten, isoliert und auf gereinigt.

Bestandteil	Menge
Plasmid-DNA	1 µg
Enzym von NEB	0,5 µl pro Enzym
Geeigneter Puffer von NEB (10x)	2 µl
Reinstwasser	Ad 20 µl

Tabelle 4-2 Typischer Restriktionsverdauansatz

4.2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung und Identifizierung von DNA-Gemischen entsprechend unterschiedlicher Fragmentgrößen erfolgte in dieser Arbeit mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese Gele wurden

hergestellt durch lösen von Agarose in TAE Puffer, in der Regel 1%ige (M/V), und anschließend aufkochen bis zum Entstehen einer klaren Flüssigkeit. Mit dieser Flüssigkeit wurden die Gele gegossen. Dem noch flüssigen Gel wurden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Um Taschen entstehen zu lassen, in die DNA geladen werden konnte, wurde ein Kamm in das erstarrende Gel gesteckt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA in Reinstwasser, pH 8,0) gefüllt. Das DNA-Gemisch wurde mit 6 x pinkem DNA-Ladepuffer von NEB versetzen und in auf dem Agarosegel vorhandene Taschen geladen. In der Regel wurde in mindestens eine Tasche des Gels eine geeignete DNA- Leiter (100bp oder 1kb Leiter, New England Biolabs) mit Fragmenten bekannter Größe aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 80 V für ca. 60-90 Minuten. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte anschließend unter UV-Licht. Wurde die DNA zur Weiterverwendung benötigt, so wurde die betreffende Bande ausgeschnitten und aufgereinigt, siehe Abschnitt 4.2.2.12.

4.2.2.11 Ligation

DNA-Fragmente (*Inserts*), die mit Restriktionsenzymen verdaut wurden und dadurch geeignete Enden aufwiesen konnten, mit zuvor ebenfalls verdauten Vektoren (*Backbone*), durch Ligation verbunden werden. Ein typischer Ligationsansatz in dieser Arbeit sah folgendermaßen aus:

Zusammensetzung	Menge
T4 Ligase	1 µl
<i>Insert</i>	X
<i>Backbone</i>	Y
T4 Ligasepuffer 10x	2 µl
Reinstwasser	Auf 20 µl

Tabelle 4-3 Pipettierschema für eine Ligationen Das Insert wurde dabei in 3-5-fachem molarem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Je nach verfügbarer Menge Insert und Backbone wurden beispielsweise 300 ng Backbone eingesetzt. Das Volumen für Insert und Backbone ergab sich entsprechend aus der Konzentration. Zur Re-Ligationskontrolle wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Insert pipettiert. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht. Die Anzahl Kolonien auf Ligations- und Kontrollplatte wurden zur Planung des weiteren Vorgehens verglichen.

4.2.2.12 Gelaufreinigung

DNA, die über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, und mit UV-Detektion identifiziert wurde, konnte bei Bedarf ausgeschnitten und mittels des Gel Aufreinigungskits von Qiagen (Qiagen Qiaquick Gel Extraction Kits) basierend auf (Vogelstein and Gillespie, 1979) isoliert und aufgereinigt

werden. Die ausgeschnittenen Gel-Stücke wurden in einem Eppendorfgefäß in 600 µl Puffer QG durch 10-minütiges Schütteln bei 50°C im Heizblock aufgelöst. Nach dem Auflösen wurden 200 µl Isopropanol (100% V/V) hinzugegeben. Um die DNA von den übrigen Gel-Bestandteilen zu isolieren, wurde das Gemisch auf eine Qiaquick Säule gegeben und bei 13300 rpm für 1 min zentrifugiert. Die auf der Säule angehaftete DNA wurde zweimal mit 750 µl Waschpuffer PE bei 13300 rpm für 1 min gewaschen. Reste des Waschpuffers wurden anschließend durch Trockenzentrifugation entfernt. Für die Elution der DNA, wurde die Qiaquick Säule in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und 30 µL Reinstwasser auf die Säule pipettiert und für 4 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde bei 13300 rpm für 1 min zentrifugiert.

4.2.2.13 DNA-Sequenzierung

Plasmid DNA (1 µg/15 µl Reinstwasser) wurde zum Sequenzieren zu Eurofins MWG (Eurofins Genomics) gesendet. Die Sequenzierung erfolgte in der Regel mit Standardsequenzier-*Primern*, wie z.B. CMV fw oder pcDNA3 rv. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem Plasmid-Editor APE (M. Wayne Davis, University of Utah) oder SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC) analysiert, ggf. wurde BLAST (National Library of Medicine) verwendet.

4.2.2.14 PCR

In dieser Studie wurden Standard Polymerasekettenreaktionen zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten durchgeführt. Hierfür wurden Q5 HF - oder Phusions-DNA-Polymerasen verwendet. Je nach verwendeter Polymerase variierte das Pipettierschema und das PCR Protokoll, siehe nachfolgende Tabellen. PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 25 oder 50 µl unter Verwendung eines *SensoQuest-Labcyclers* durchgeführt.

Unmodifizierte DNA-Oligos wurden von Eurofins MWG (Eurofins Genomics) in einem HPSF-Reinheitsgrad gekauft. Die Schmelztemperaturen wurden mit dem Thermo Scientific Online-Tool „T_m calculator“, falls Phusion DNA Polymerase verwendet wurde oder dem Programm SnapGene, falls Q5 HF verwendet wurde, berechnet. Im Fall von Phusion DNA Polymerase wurden 5°C abgezogen. Im Fall von Q5 HF 5°C addiert. Mutagenese-PCR wurde durchgeführt, wie in 4.2.2.15 beschrieben.

Volumen	Reagenz
18,25 µl	H ₂ O
5 µl	Puffer (5xGC oder HF)
0,5 µl	<i>Template</i> (0,1 µg/µl)

Material und Methoden

0,8 µl	<i>Primer</i> (10 µM) 0,4 µl <i>forward</i> und 0,4 µl <i>reverse</i>
0,5 µl	Nukleotide (10 mM dNTPs)
0,25 µl	Phusion Polymerase

Tabelle 4-4 PCR Reaktionsansatz für Phusion DNA Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	98°C	3‘
2. Denaturierung	98°C	30“
3. Annealing	T _M	30“
4. Elongation	72°C	60“
5. Finale Elongation	72°C	10‘
Ende	4°C	∞

Tabelle 4-5 Standard PCR Programm für Phusion DNA Polymerase Schritte 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt.

Volumen	Reagenz
35 µl	H ₂ O
10 µl	Puffer (5xQ5 Reaction Buffer)
0,5 µl	<i>Template</i> (0,1 µg/µl)
2 µl	<i>Primer</i> (10 µM) entweder 1 µl <i>forward</i> und 1µl <i>reverse</i> oder 2 µl <i>forward</i>
2 µl	Nukleotide (10 mM dNTPs)
0,5 µl	Q5 HF DNA Polymerase

Tabelle 4-6 PCR Reaktionsansatz für Q5 HF DNA Polymerase von NEB

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	98°C	3‘
2. Denaturierung	98°C	30“

3. Annealing	TM	30“
4. Elongation	72°C	60“
5. Finale Elongation	72°C	10“
Ende	4°C	∞

Tabelle 4-7 Standard PCR Programm für Q5 HF DNA Polymerase von NEB Schritte 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt.

4.2.2.15 Mutagenese PCR

Um gezielt Punktmutationen oder zusätzliche Aminosäuren in die Aminosäuresequenz eines Proteins einzufügen, wurde die Plasmid DNA des betreffenden Proteins mit Hilfe spezieller Mutagenese-*Primer* durch PCR basierte QuickChange® Mutagenese PCR modifiziert, basierend auf (Braman *et al.*, 1996). Die für diese Methode in dieser Arbeit designten *Primer* wiesen in ihrer Mitte ein oder mehrerer nicht komplementäre Basen auf. 15 Nucleotide rechts und links von den „fehlerhaften“ Basen waren komplementär zum *Template*. Auf diese Weise wurde entweder nur ein *Forward-Primer* oder zusätzlich ein revers-komplementär designter *Primer* verwendet. Je nach verwendeter Polymerase variierte das Pipettierschema und das PCR Protokoll:

Volumen	Reagenz
31 µl	H ₂ O
10 µl	Puffer (5xGC)
3,5 µl	DMSO
0,5 µl	<i>Template</i> (0,1 µg/µl)
2 µl	<i>Primer</i> (10 µM) entweder 1 µl <i>forward</i> und 1µl <i>reverse</i> oder 2 µl <i>forward</i>
2 µl	Nukleotide (10 mM dNTPs)
1 µl	Phusion Polymerase

Tabelle 4-8 Mutagenese-PCR Reaktionsansatz für Phusion DNA Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	98°C	10“
2. Denaturierung	98°C	30“
3. Annealing	56/60°C	30“

Material und Methoden

4. Elongation	72°C	10‘
5. Finale Elongation	72°C	10‘
Ende	4°C	∞

Tabelle 4-9 Mutagenese-PCR Programm für Phusion DNA Polymerase Schritte 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt.

Volumen	Reagenz
35 µl	H ₂ O
10 µl	Puffer (5xQ5 Reaction Buffer)
0,5 µl	Template (0,1 µg/µl)
2 µl	Primer (10 µM) entweder 1 µl forward und 1µl reverse oder 2 µl forward
2 µl	Nukleotide (10 mM dNTPs)
0,5 µl	Q5 HF DNA Polymerase

Tabelle 4-10 Mutagenese-PCR Reaktionsansatz für Q5 HF DNA Polymerase von NEB

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	98°C	3‘
2. Denaturierung	98°C	30‘‘
3. Annealing	56/60°C	30‘‘
4. Elongation	72°C	8‘
5. Finale Elongation	72°C	10‘
Ende	4°C	∞

Tabelle 4-11 Mutagenese-PCR Programm für Q5 HF DNA Polymerase von NEB Schritte 2 bis 4 wurden 35 mal wiederholt.

Im Anschluss an die Mutagenese PCR wurde zunächst die DNA aufgereinigt. Dies geschah entweder über eine Säule aus dem Gel Aufreinigungskit, wie in Abschnitt 4.2.2.12 beschrieben oder über eine so genannte Ethanol Fällung. Bei der Ethanol fällung wurde die DNA durch Zugabe von 5 µl Na-Acetat (3 M) und 137 µl Ethanol (100 % v/v). Durch 10-minütige Zentrifugation bei 13300 rpm wurde die DNA

pelletiert und anschließend mit 150 µl Ethanol (70 % v/v) gewaschen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 13300 rpm). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet. Um die zu Beginn eingesetzte *Template*-DNA zu entfernen wurde ein DpnI Verdau angesetzt. DpnI schneidet spezifisch methylierte DNA. Die *Template*-DNA wurde zuvor aus *E. coli* isoliert, weswegen sie methyliert war. Hierzu wurde die DNA in 17 µl Reinstwasser gelöst und 2 µl CutSmart Puffer von NEB und 1 µl DpnI hinzugegeben. Der Restriktionsansatz wurde mindestens 2 h bei 37 °C inkubiert geschüttelt. Anschließend wurden 3 µl des Restriktionsverdaus in chemisch kompetenten *E. coli* mit der Hitzeschock-Methode transformiert, siehe 4.2.2.4. Im Anschluss wurden eine Kolonie gepickt und damit eine Übernachtskultur angesetzt 4.2.2.1 und schließlich eine Midi durchgeführt 4.2.2.7. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung sichergestellt 4.2.2.13.

4.2.2.16 Gibson Assembly

Für die Konstruktion verschiedener FRET-Rezeptor-Sensoren wurde das *Gibson Assembly® Cloning Kit* von NEB verwendet. Bei der Gibson Reaktion handelt es sich um eine isothermale Einzelreaktion, bei der durch die konzertierte Wirkung einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase mehrere DNA-Fragmente nahtlos und ohne die Verwendung von Restriktionsendonukleasen in einen linearisierten Vektor kloniert werden können (Gibson et al. 2009). In dieser Studie wurde mit dem *Gibson Assembly® Cloning Kit* jeweils nur ein *Insert* in einen Vektor eingebracht. DNA-Stücke die mit diesem Kit aneinandergehangen wurden, mussten zueinander komplementäre Abschnitte aufweisen. Durch PCR unter Verwendung geeignet designter *Primer* wurde der Vektor geöffnet und an beiden Enden jeweils um ein zum *Insert* komplementäres Stück verlängert. Das zum *Insert* komplementäre Stück wies im Programm *SnapGene* eine Annealingtemperatur, die möglichst nah an 50°C lag, auf. Ebenfalls durch PCR mit geeignet designten *Primern* wurde das *Insert* beidseitig um ein zur jeweiligen Seite des Vektors komplementäres Stück verlängert. Die *Insert*- und Vektor PCR wurden zusammen mit geeigneten Markern auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt, siehe 4.2.2.10. Anschließend wurden die korrekten Banden identifiziert, ausgeschnitten und über eine Säule aufgereinigt, siehe 4.2.2.12. Mit dem PCR Produkt des Vektors wurde ein DpnI Verdau angesetzt. Im Anschluss wurde der Gehalt von *Insert* und Vektor bestimmt und die Gibson Reaktion zusammen pipettiert siehe *Tabelle 4-12*. Das *Insert* wurde dabei in 3-5-fachem molarem Überschuss gegenüber dem Vektor eingesetzt. Der Gibson Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Dann wurden 0,5 µl des Gibson Reaktionsansatzes in 12,5 µl chemisch kompetenten *E. coli* mit der Hitzeschock-Methode transformiert, siehe 4.2.2.4. Falls sich das Produkt aus *Insert* und Vektor von dem *Template* durch Schnittstellen unterschied, wurde die DNA von verschiedenen Kolonien aufgereinigt (Minis) und ein geeigneter Restriktionsverdau durchgeführt. Die verdaute DNA wurde auf ein Gel aufgetragen um zu entscheiden bei welchem Klon der Einbau erfolgreich war. Von diesem Klon

wurde dann eine 100 ml Übernachtskultur an geimpft und eine Midi durchgeführt. Der Erfolg der Klonierung wurde durch anschließende Sequenzierung sichergestellt, siehe 4.2.2.13.

Zusammensetzung	Menge
Gibson Mastermix	10 µl
<i>Insert</i>	z.B.: 50 ng
Vektor	z.B.: 100 ng
Reinstwasser	Auf 20 µl

Tabelle 4-12 Gibson Assembly Reaktionsansatz

4.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

4.2.3.1 Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Messungen in einzelnen Zellen

Zellen, die fluoreszenzmarkierte Proteine transient oder stabil exprimieren, wurden 24 h vor der Messung gesplittet und auf Deckglässchen ausplattiert, siehe Abschnitt 4.2.1.4. Die FRET-Messungen wurden an einzelnen lebenden Zellen durchgeführt. Während fluoreszenzmikroskopischer Experimente mit lebenden HEK293T-, HEK293- oder HeLa- Zellen wurden diese in physiologischer Salzlösung gehalten (in mM: 137 NaCl, 5,4 NaCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH = 7,32), die nachfolgend als extrazellulärer Puffer (ECS) bezeichnet wird. ECS für kombinierte FRET *Patch-Clamp* Messungen wurde ohne CaCl₂ angesetzt.

4.2.3.2 Theoretischer Hintergrund

Mithilfe von FRET Messungen ist es möglich in Echtzeit in lebenden Zellen Protein-Protein Interaktionen oder Protein-Konformationsänderungen zu untersuchen. Dieser Methode liegt ein strahlungsfreier Transfer von Elektronenanregungsenergie zwischen gleichartigen Molekülen in Lösung zugrunde, der erstmals 1946 von Theodor Förster beschrieben wurde (Förster, 1948).

Durch die Entdeckung des Grün fluoreszierendes Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* 1962 und in der Folge der Weiterentwicklung genetischer Methoden, die die Möglichkeit GFP mit beliebigen anderen Proteinen, Gen-spezifisch, zu fusionieren, eröffneten sich die Möglichkeit der heutigen Anwendung von FRET in der Molekularbiologie. Bei den in dieser Studie durchgeführten FRET Messungen wurde die Energie von einem angeregten Donorfluorophor, Cyan fluoreszierendes Protein (CFP) oder Variante, auf ein Akzeptorfluorophor, Gelb fluoreszierendes Protein (YFP) oder Variante, strahlungsfrei übertragen. Diese übertragene Energie emittiert das Akzeptorfluorophor als Licht, auch eine Strahlungsfreie Abgabe ist möglich (Miyawaki, 2011). Die in dieser Studie für FRET Messungen

verwendeten Fluorophore waren spektrale Varianten von GFP, die sich in der Regel durch Punktmutationen unterschieden. Die in dieser Studie verwendete Anregungswellenlänge von 430 nm regte im Wesentlichen Cyan fluoreszierendes Protein (CFP) an *Abbildung 4-2*. Ebenfalls in *Abbildung 4-2* ist zu erkennen, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt. Dies ist eine der drei Hauptvoraussetzungen für das Auftreten von FRET (Lohse *et al.*, 2012). Zweite Hauptvoraussetzung ist, dass die Ausrichtung des Übergangsdipols idealerweise parallel sein sollte.

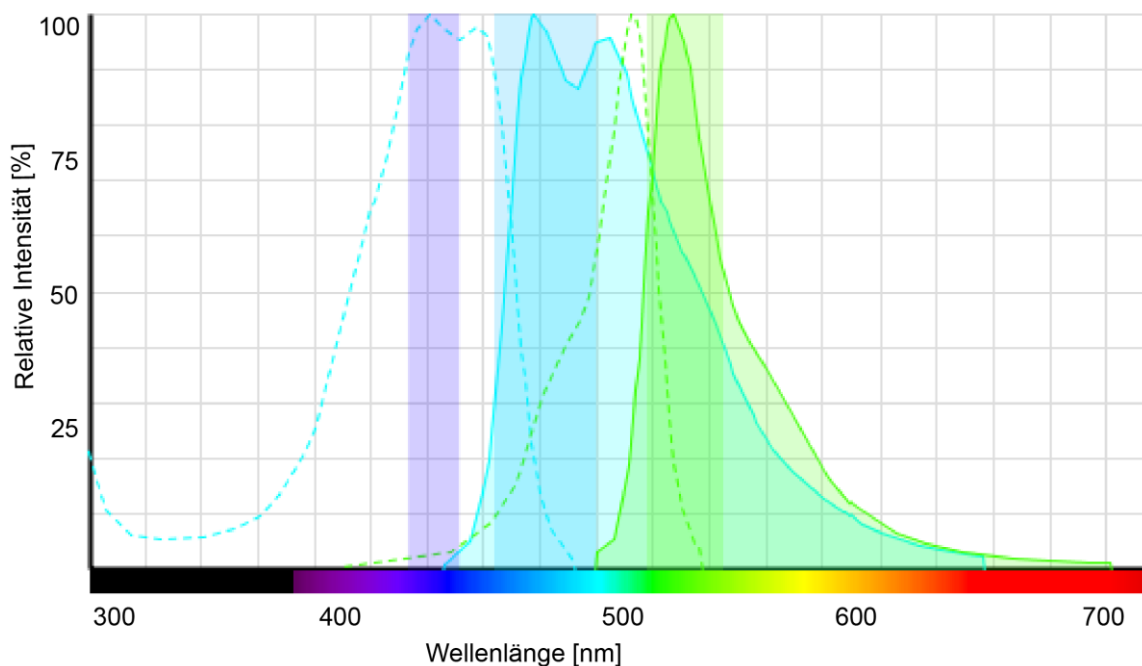


Abbildung 4-2 Absorptions- und Emissionsspektren von CFP und YFP Das Bild wurde mit dem Online-Tool „Fluorescence SpectraViewer“ der Firma Thermo Fisher erzeugt (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>)

Drittens muss der Abstand der beiden Fluorophore ≤ 10 nm sein (Lohse *et al.*, 2012). Dies wird in der Funktion ersichtlich, die Zusammenhang der FRET Effizienz und dem Abstand von Donor- und Akzeptorfluorophor beschreibt:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$$

r... Abstand zwischen den Fluorophoren

R_0 ... Förster Radius

E... FRET Effizienz

Daraus geht hervor, dass die Effizienz dieses Energietransfers umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor ist, was FRET extrem empfindlich gegenüber kleinen Abstandsänderungen macht, wie sie bei Protein-Protein Interaktionen und Protein Konformationsänderungen auftreten. Der Förster-Radius (R_0) bezeichnet den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem FRET Effizienz 50 % beträgt. Der Försterradius ist abhängig vom Orientierungsfaktor der Dipole, der Fluoreszenzquantenausbeute, dem Brechungsindex des Mediums und dem Überlappungsintegral der Spektren. In *Abbildung 4-3* wurde die FRET Effizienz in Abhängigkeit des Abstands der Fluorophore für den Förster Radius für das in dieser Studie verwendete FRET Paar CFP-YFP (4,9 nm (Bajar *et al.*, 2016)) gezeichnet. In dieser *Abbildung* ist sehr gut der beschriebene invers exponentielle Zusammenhang zwischen dem Abstand von Donor- und Akzeptorfluorophor und FRET Effizienz zu erkennen. In dieser Studie wurden dynamische FRET Messungen durchgeführt. Hierzu zählten Inter- und Intramolekulare FRET Messungen. Während der Messungen wurde sowohl die Emission des Donors als auch die des Akzeptors gemessen.

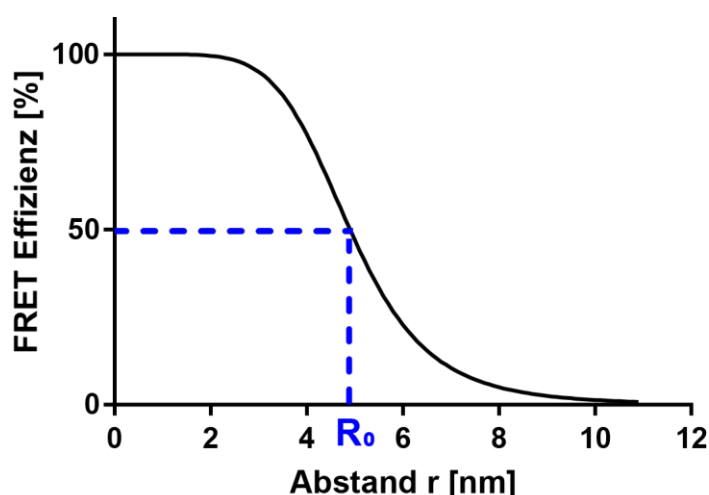


Abbildung 4-3. Zusammenhang der FRET Effizienz und dem Abstand von Donor- und Akzeptorfluorophor
Berechnete Exponentialfunktion für den Zusammenhang der FRET Effizienz und dem Abstand von CFP (Donorfluorophor) und YFP (Akzeptorfluorophor). Als Förster Radius (R_0 , in blau) wurden 4,9 nm (Bajar *et al.*, 2016) angenommen.

Bei dynamischen FRET Messungen wird üblicherweise Korrekturen der Gesamtakzeptor – Emission (in dieser Studie Gesamt YFP – Emission) durch zwei Faktoren durchgeführt: Die Korrektur der "Falschanregung" des Akzeptors durch die Donoranregungswellenlänge und die des "Durchblutens" der Donoremission in den Akzeptoremissionskanal aufgrund spektraler Überlappung (Berney and Danuser, 2003). Die Kombination von FRET-Messungen mit Elektrophysiologie ermöglichte keine Messung der Gesamt-YFP-Emission nach jeder Messung, die zur Berechnung der tatsächlichen YFP-Emission erforderlich gewesen wäre. Deshalb konnten in dieser Arbeit keine Korrekturen der YFP-Emission durchgeführt werden.

4.2.3.3 Ansetzen von Agonisten für FRET Messungen

In dieser Studie wurden die Prostanoid-Liganden U46619 (16450), 8-iso-Prostaglandin E₁, 8-iso-Prostaglandin E₂, I-BOP, 15-Keto-Prostaglandin E₂, 15 (S)-15-Methylprostaglandin E₂, PTA₂, Prostaglandin E₂-Ethanolamid, Prostaglandin E₂-Methylester, SQ 29,548 und Iloprost verwendet. U46619 wurde in Methylacetat gelöst geliefert. Das Methylacetat wurde unter Stickstoffdampf verdampft und U46619 wurde in 100% EtOH gelöst und die Konzentration auf 2,5 mM eingestellt. Aliquots (20 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäß) wurden bei -20°C gelagert, vergleiche (Bodmann *et al.*, 2017). Für FRET-Messungen wurde U46619 in 0,1% (M/V) delipidiertes BSA haltigen ECS gelöst. Als Kontrolllösung wurde 0,1% (M/V) BSA-ECS mit der jeweiligen Menge an 100% EtOH verwendet. Die restlichen oben genannten Liganden wurden als Feststoffe geliefert, hier entfiel der Verdampfungsschritt. Die übrigen, oben beschriebenen Schritte erfolgten in ähnlicher Weise.

Weiterhin verwendeten wir in dieser Studie Daltroban, Ramatroban, LHX445, LHX447 und LHX 467. Diese Substanzen wurden als Feststoff geliefert in DMSO gelöst und die Konzentration auf 25 mM eingestellt. U46619 und SQ 29,548 für Messungen in Platten wurde ebenfalls in DMSO gelöst. Die übrigen Schritte erfolgten analog.

Für Messungen mit Isoprenalin wurden zunächst Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mM angesetzt. Dies geschah durch abwiegen einer entsprechenden Menge Isoprenalin und anschließendem Lösen in der entsprechenden Menge Reinstwasser. Zu der Stammlösung wurde Ascorbinsäure hinzugegeben um eine Oxidation zu verhindern. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert und wiederholt für Messungen verwendet. Für FRET-Messungen wurde Isoprenalin aus der Stammlösung zu ECS hinzugegeben.

Thrombin lag gelöst im im Novagen Protein-Aufreinigungs-Kit vor. Die entsprechende Menge der Thrombin Lösung zum Erreichen von 1 U/ml wurde entnommen und für FRET-Messungen dem ECS zugesetzt.

Endothelin 1 wurde in Reinstwasser gelöst und die Konzentration auf 100 µM eingestellt. Aliquots (20 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäß) wurden bei -20°C gelagert. Für FRET-Messungen wurde das aliquotierte Endothelin 1 mit ECS verdünnt.

4.2.3.4 F₅₃₅, F₄₈₀, F₅₃₅/F₄₈₀

Da die Emissionsintensitäten bei den FRET-Messungen nicht korrigiert wurden, wurde stattdessen als Bezeichnung der einzelnen Farbkanäle die Fluoreszenzintensitäten gemäß den Spezifikationen der Emissionsfilter angegeben: D480/40M mit hauptsächlich CFP Emission bezeichnet als F₄₈₀ (Donorfluoreszenz) und HQ535/30M mit hauptsächlich YFP Emission bezeichnet als F₅₃₅

(Akzeptorfluoreszenz), siehe *Abbildung 4-2*. Das Akzeptor-zu-Donor-Emissionsverhältnis wurde berechnet (F_{535} / F_{480}) und in dieser Arbeit als "Emissionsratio" bezeichnet.

4.2.3.5 Durchführung der FRET Messungen

Die auf Deckgläschen ausplattierten Zellen wurden zweifach mit ECS gespült und anschließend bedeckt und in eine Attofluor-Messkammer (Invitrogen) eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem invertierten Axiovert 135 Zeiss Mikroskop ausgerüstet mit 100x-A-Plan Öl Immersions Objektiv (Zeiss) einem Dual Emissionsphotometrischen System (TILL Photonics) durchgeführt. Während der Messung wurden die Zellen über ein schnell schaltendes Druckluft Perfusionssystem mit acht Kanälen (Ala Scientific Instruments, Ala-VC3-8SP) kontinuierlich mit ECS oder agonisthaltigem ECS umspült. Durch dieses System war ein Lösungsaustausch in wenigen ms möglich. Auf diese Weise konnten Agonisten-vermittelte Veränderungen im FRET untersucht werden. Ein schwarzer Balken in jedem Diagramm, der mit Konzentration und dem Typ des Agonisten beschriftet ist, zeigt die Dauer der Agonistenapplikation an. Für die Einzelzellmessungen wurden Zellen zunächst im Suchmodus (Abwechselnd CFP, YFP und kein Licht) ausgewählt die sichtbar umspült werden konnten und beide Fluorophore in der adäquaten Lokalisation exprimierten. Für die FRET Messungen wurden Zellen mit Licht einer Wellenlänge von 430 nm (Exzitationsfilter ET 436/20x, DCLP 460 nm, Chroma Technology), mit einer Frequenz von 1 Hz, 2,5 Hz oder 5 Hz und einer Belichtungszeit von 5 ms mit einer Xenon Lampe (Polychrom V, TILL Photonics) angeregt. Die Emissionsintensitäten beider Fluorophore (F_{535} , F_{480} ; DLCP 515, Emissionfilter CFP D480/40M und YFP HQ535/30M, alle Filter von Chroma Technology) wurde separat von hochauflösenden Photodioden detektiert (TILL Photonics). Ein im EPC-10-Verstärker (HEKA) enthaltener Analog-Digital-Wandler wandelte Fluoreszenzintensitätssignale in digitale Daten um, die mit der Patchmaster-Software 2.65 (HEKA) auf einem Computer gespeichert wurden. Weiterhin berechnete die Software den Quotienten aus F_{535}/F_{480} .

4.2.3.6 Bleichkorrektur

Während der in dieser Arbeit durchgeführten FRET Messungen wurden Fluorophore mit Lichtpulsen hoher Intensität angeregt. Dadurch kommt es zu einem Prozess bei dem Fluorophore durch das Anregungslicht chemisch so verändert werden, sodass diese nach einer gewissen Zeit ihre Fähigkeit zu fluoreszieren verlieren. Man spricht von Photobleichen (Song et al. 1995). Dieses Photobleichen wurde bei allen FRET-Messungen, außer FRET-Messungen mit dem Epac1-cAMP Sensor, durch Subtraktion einer monoexponentiellen Funktion, entweder über die Länge des gesamten Graphen oder insbesondere bei längeren Messungen mit dem TP-Rezeptor-Sensor und auftretenden Baselineverschiebungen, abschnittsweise korrigiert. Diese Subtraktion erfolgte mithilfe von mit Origin Pro 2016. In *Abbildung*

4-4 ist die vorgenommene Bleichkorrektur beispielhaft an einer FRET-Messung an einer mit TP-Rezeptor-Sensor stabil transfizierten HEK293-Zelle, die mit 3 μM U46619 stimuliert wurde, gezeigt.

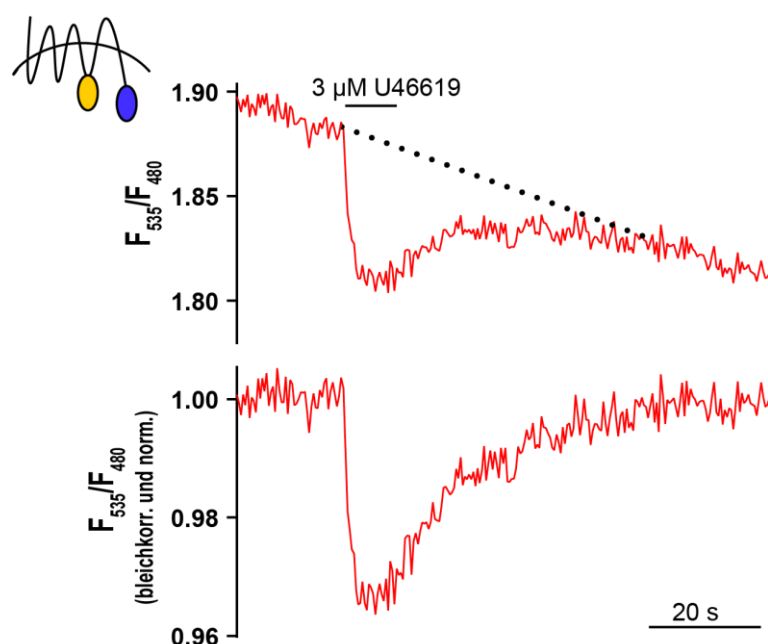


Abbildung 4-4 Durchführung der Bleichkorrektur Repräsentative Messung einer HEK293-Zelle, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierte und mit 3 μM U46619 stimuliert wurde. Die Emissionsratio (F_{535}/F_{480}) wurde vor (oben) und nach (unten) der Bleichkorrektur durch Subtrahieren einer monoexponentiellen Kurve (gestrichelte Linie) und anschließend Normalisieren dargestellt.

4.2.3.7 Normalisierung

Um die Daten mehrerer Zellen, trotz unterschiedlicher initialer Emissionsratio, zu mitteln, war es notwendig Normalisierungen durchzuführen. Hierfür wurden die zuvor bleichkorrigierten Graphen in den meisten Fällen durch die von der maximalen Agonistkonzentration hervorgerufene $\Delta F_{535}/F_{485}$ geteilt. Im Gegensatz dazu wurden zur Beurteilung der Güte von FRET-Rezeptor-Sensoren die bleichkorrigierten Emissionsratios durch Division des durchschnittlichen FRET-Wertes vor der Stimulation mit Agonist normalisiert, TP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 5-3*, IP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-1*, FP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-3* und ET_B -Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-4*. Für die Normalisierung der Messungen am Epac1-cAMP Sensor wurde statt einer Bleichkorrektur der Startwert vor Agonistapplikation abgezogen und eine Division mit durch maximale Agonistkonzentration hervorgerufene $\Delta F_{535}/F_{485}$ durchgeführt, *Abbildung 5-14*.

Um die Aktivierungs und Deaktivierungskinetiken des TP-Rezeptor-Sensors in Einzelzellmessungen zu vergleichen, *Abbildung 5-6*, wurde der Startwert von den Werten der Emissionsratio abgezogen und durch den Wert des Plateaus dividiert bzw. das Plateau abgezogen und durch den Startwert der Kinetik dividiert.

4.2.3.8 Auswertung von Kinetiken

Die Bestimmung der Kinetik der TP-Rezeptoraktivierung in Einzelzellmessungen nach Agonistapplikation wurde durchgeführt, indem mit der FRET-Antwort des TP-Rezeptor-Sensors eine monoexponentielle Funktion mit festgelegtem Plateau berechnet wurde, *Abbildung 5-6*. Die Berechnung der monoexponentiellen Funktion zu den jeweiligen Graphen und der jeweiligen $t_{0,5}$ -Werte wurde mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) durchgeführt. Der Berechnung lag folgende Formel zu Grunde: $Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) * (1 - \exp(-K * x))$, mit Y_0 ist der Y-Wert zum Zeitpunkt $X = 0$, Plateau ist der Y-Wert wenn der X-Wert gegen unendlich geht und K ist die Geschwindigkeitskonstante.

Die Bestimmung der Kinetik der Rezeptordeaktivierung nach Agonistwegnahme oder Repolarisation wurde analog ohne festgelegtes Plateau durchgeführt, *Abbildung 5-6*. Dieser und den folgenden Deaktivierungskinetiken lag folgende Formel zugrunde: $Y = (Y_0 - \text{Plateau}) * \exp(-K * X) + \text{Plateau}$, mit Y_0 ist der Y-Wert zum Zeitpunkt $X = 0$, Plateau ist der Y-Wert wenn der X-Wert gegen unendlich geht und K ist die Geschwindigkeitskonstante.

Die Bestimmung der Kinetik der Deaktivierung am TP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 6-4B*, und der TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion, *Abbildung 6-3C*, erfolgte ab drei Sekunden langer Daltroban Gabe, Die Berechnung der monoexponentiellen Funktion zu den jeweiligen Graphen und der jeweiligen $t_{0,5}$ -Werte wurde mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) durchgeführt.

Die Bestimmung der Kinetik der Deaktivierung des TP-Rezeptor- bzw. -Mutante-induzierten Signals der $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion, *Abbildung 6-1A, B*, *Abbildung 6-8A-D* und *Abbildung 6-12A-D* erfolgte jeweils ausgehend vom Maximum. Die Berechnung der monoexponentiellen Funktion zu den jeweiligen Graphen und $t_{0,5}$ -Werte wurde mit GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) durchgeführt.

4.2.3.9 Auswertung von Konzentrations-Wirkungskurven

Zur Messung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden einzelne transfizierte Zellen mit Testkonzentrationen des untersuchten Agonisten umspült, gefolgt von einer Referenzkonzentration. $\Delta F_{535}/F_{480}$ der getesteten Konzentrationen wurden auf $\Delta F_{535}/F_{480}$ der Referenzkonzentration normalisiert. Die Messung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für TP-Rezeptor-Sensor in *Abbildung 5-6A* erfolgte unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung, alle anderen Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden ohne Kontrolle der Membranspannung durchgeführt.

Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden in GraphPad Prism gefittet. Hierfür wurde folgende Funktion genutzt (*dose-response, variable slope*):

$$Y = \text{Bottom} + (X^{\text{Hill-Koeffizient}} * (\text{Top} - \text{Bottom})) / (X^{\text{Hill-Koeffizient}} + EC_{50}^{\text{Hill-Koeffizient}})$$

Material und Methoden

Bottom ist das untere und *Top* das oberer Plateau, *x* der Logarithmus der Konzentration, *Y* ist die relative Antwort, $\log EC_{50}$ ist der X-Wert bei einer 50%-Antwort und die Hill-Koeffizient gibt die Steilheit der Kurve an. In der folgenden Tabelle wurde jeweils angegeben, ob für die durchgeführten *Fits* Einschränkungen vorgenommen wurden, sowie weitere nähere Angaben zur Durchführung des *Fits*.

Assay	Abbildung	Einschränkungen	GraphPad Prism Version
TP-Rezeptor-Sensor	<i>Abbildung 5-6A</i>	Keine	7
TP-Rezeptor-Sensor	<i>Abbildung 5-3C</i>	Festgelegte Ober- und Untergrenze	7
Gα₁₃-p115-RhoGEF-InteraktionsAssay	<i>Abbildung 5-10B</i>	Festgelegte Ober- und Untergrenze Hill-Koeffizient auf den Wert gesetzt wurde, der durch die TP-Rezeptor-wt-Kurve (0,85) erhalten wurde (Krett, 2015)	7
TP-Rezeptor-GRK2-Interaktion	<i>Abbildung 5-6D</i>	Keine	7
TP-Rezeptor-Sensor und Gα₁₃-p115-RhoGEF-InteraktionsAssay	<i>Abbildung 5-8A</i>	Festgelegte Untergrenze	7
Gα₁₃-p115-RhoGEF-InteraktionsAssay	<i>Abbildung 6-11B</i>	Festgelegte Untergrenze	8
FP-Rezeptor-Sensor	<i>Abbildung 7-3E</i>	Festgelegte Ober- und Untergrenze	8
IP-Rezeptor-Sensor	<i>Abbildung 7-1D</i>	Festgelegte Ober- und Untergrenze	8

4.2.3.10 Erstellung von Rezeptorfunktions-Spannungs-Kurven

Mit dem TP-Rezeptor-Sensor-Konstrukt, das stabil in HEK293-Zellen exprimiert wurde, erfolgten FRET-Messungen unter gleichzeitiger Kontrolle von V_M mittels *Patch-Clamp*. Die FRET Antwort auf entweder 50 nM oder 200 nM U46619, *Abbildung 5-4C*, wurde bei unterschiedlichen Spannungen gemessen. Die angewendeten Spannungen variierten, wobei in allen Zellen -90 mV und 0 mV eingeschlossen wurden. Die erhaltenen $\Delta F_{535}/F_{485}$ der unterschiedlichen Spannungen wurden auf die Änderung von $\Delta F_{535}/F_{485}$ bei 0 mV normalisiert. Die so erhaltenen Werte wurden mittels GraphPad Prism 7 mit einer Boltzmann Funktion gefittet:

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + \exp\left(\frac{V_{0.5} - X}{k}\right)}$$

Mit *Bottom* und *Top* als minimales bzw. maximales Plateau, *X* ist das jeweilige V_M , $V_{0.5}$ entspricht dem halb-maximalen Spannungseffekt auf die beobachtete Interaktion und *k* als Fakto, der die Steilheit der Kurve wiedergibt.

Für die Berechnung des *z*-Wertes wurde *Top* durch Normalisierung der Kurve mit dem erhaltenen *Top* Wert in Grenzen zwischen 0 und 1 gebracht, so dass *Y* als Fraktion der aktivierten Rezeptoren betrachtet werden konnte. Mit den erhaltenen Werte wurde eine neue Boltzmann Funktion berechnet, anhand derer der *z*-Wert berechnet wurde. Die hierfür genutzte Formel (da zur Vereinfachung eine Temperatur von 25°C angenommen wurde) lautete: $z = -26/\text{Steigung}$.

4.2.4 Kontrolle des Membranpotentials durch die *Patch-Clamp* Technik

Mithilfe der *Patch-Clamp*-Methode ist es möglich, Ionenströme durch die Plasmamembran und das Membranpotential von Zellen zu messen (Im *voltage clamp* bzw. im *current clamp* Modus) (Hamill *et al.*, 1981).

In dieser Studie wurde die *Patch-Clamp*-Methode im *voltage clamp* Modus dazu verwendet, um das Membranpotential der mit für die FRET Messung geeigneten fluoreszenzmarkierten Proteinen transfizierten Einzelzellen während der FRET Messungen zu kontrollieren und auf die gewünschten Werte einzustellen. Die Messung und die Einstellung des Potentials erfolgte über eine Messelektrode und einer Referenzelektrode. Bei beiden Elektroden handelte es sich um mit Silberchlorid überzogene Silberelektroden. Die Referenzelektrode befand sich während der Messung in auf der Attofluor-Messkammer befindlicher ECS. Die Messelektrode befand sich in einer mit Pipettenlösung gefüllten Mikropipette. Die Zusammensetzung der Pipettenlösung war des Zytosols nachempfunden (in mM: 105 K^+ Aspartat, 5 NaCl, 40 KCl 20 HEPES, 7 $MgCl_2$, 10 EGTA, 0,025 GTP, 5 Na^+ ATP, pH = 7,2). Die

für *Patch-Clamp* verwendeten Mikropipetten (Widerstand von 3 bis 7 M Ω) wurden an jedem Versuchstag aus Borosilikatglaskapillaren (GC150F-10, Harvard Apparatus) unter Verwendung eines horizontalen P-87-Pipettenziehgerätes (Sutter Instruments) gezogen. Unter optischer Kontrolle und mit Zuhilfenahme des Mikroskops wurde die Pipette kontrolliert mit einem Mikromanipulator nah an der Zelle platziert. Auf der Pipette befand Überdruck der durch eine mit der Pipette verbundenen Spritze, die mit einem Dreiwegehahn kombiniert war, generiert wurde. Durch den Überdruck wurde die Zellmembran durch die sich annähernde Pipette leicht eingedrückt. In unmittelbarer Nähe der Zelle wurde dieser Überdruck abgelassen, so dass sich die Zelle sich um die Pipette legte. In vielen Fällen reichte dies bereits um einen Abdichtwiderstand im Gigaohm Bereich zu erreichen. Falls dies nicht der Fall war, wurde sofort leichter Unterdruck durch die Spritze appliziert, bis der Abdichtwiderstand den Gigaohm Bereich erreichte. Die Zelle wurde anschließend durch Erzeugung Applikation eines Unterdrucks geöffnet, so dass die Pipettenlösung und die Zelle ein Kontinuum mit dem Zellinnenraum bildeten. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die, eben beschriebenen, Ganzzellableitung verwendet. Mittels eines Verstärkers (EPC-10, HEKA), der auf den *voltage clamp* Modus eingestellt wurde, konnte in der folgenden Messung das Membranpotential (V_M) kontrolliert werden.

4.2.5 FRET Messungen unter direkter Kontrolle des Membranpotentials

Mit einer Kombination aus FRET-Messung von intramolekularen Konformations-Sensoren oder Protein-Protein-Wechselwirkungen und der *Patch-Clamp* Technik im *voltage clamp* Modus konnte in dieser Studie die Beeinflussung der Rezeptoraktivität von GPCRs durch Änderung der Membranspannung direkt und indirekt gemessen werden. *Abbildung 4-5* veranschaulicht eine Zelle, die mit einem intramolekularen Rezeptor-Sensor transfiziert worden ist und sich in der Gesamtzellkonfiguration befand. Die Zellen wurden angeregt und die Fluoreszenzintensitäten aufgezeichnet, siehe Abschnitt 4.2.3.5. Gleichzeitig wurde das Membranpotential kontrolliert. In allen Zellen wurde mit einem Haltepotential von -90 mV gestartet und gegebenenfalls mittels des EPC-10 Verstärkers (HEKA) auf ein oder mehrere Testpotentiale geschaltet. Der Verlauf des Membranpotentials während der Messungen wurde als schwarzer rechteckiger Pulsbalken unter jeder Messung dargestellt. Für alle gezeigten Messungen, außer in *Abbildung 6-2*, wurden HEK293(T)-Zellen verwendet.

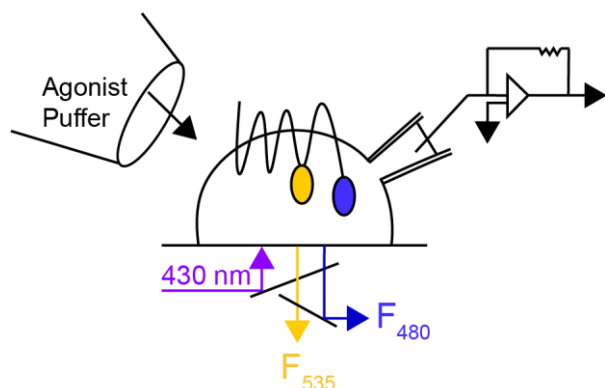


Abbildung 4-5 Schematische Darstellung einer kombinierten FRET und Patch-Clamp Messung
Das Schema veranschaulicht den experimentellen Aufbau, der für FRET-Messungen unter Kontrolle der Membranspannung angewendet wurde. Zu sehen ist eine HEK293-Zelle, die einen GPCR-Rezeptor-Sensor exprimiert und deren Membranspannung durch einen Verstärker (rechts) kontrolliert wurde. Die Zellen wurden während der Messung kontinuierlich mit Puffer oder Agonisten enthaltendem Puffer aus einer

Pipette (links) mithilfe eines druckluftgestützten Perfusionssystems umspült. Während der Messung wurde mit einer Wellenlänge von 430 nm (violett) angeregt, und gleichzeitig die Donoremissionen (F480, blau) und Akzeptoremissionen (F535, gelb) aufgezeichnet.

4.2.6 Messungen von GIRK Strömen in HEK293T-Zellen

GIRK-Ströme wurden in der Gesamtzellkonfiguration analog zu den FRET-Messungen bei gleichzeitiger Kontrolle des Membranpotentials mit einer Samplefrequenz von 1 kHz gemessen. HEK293T-Zellen wurden für diese Messungen mit GIRK Kanälen transfiziert. Die für diese Messungen verwendete extrazelluläre Lösung enthielt eine hohe Konzentration an Kalium (in mM: 137 KCl, 5,4 NaCl, 10 HEPES, 1 MgCl₂, pH = 7,32). Daher waren die aufgezeichneten GIRK-Ströme Einwärtsströme (Haltepotential: entweder -90 mV oder -30 mV, wie angegeben). Um GIRK-Ströme spezifisch zu blocken wurde Barium eingesetzt. Hierfür wurden der extrazellulären Lösung, die eine hohe Konzentration an Kalium enthielt, BaCl₂·2H₂O zugegeben, so dass eine Konzentration von 500 µM Ba²⁺ resultierte.

4.2.7 Auswertung der Messdaten und Statistik

Die Rohdaten wurden als AscII-Dateien exportiert und mit Origin Pro 2016 oder GraphPad Prism 7, Abschnitt 5 bzw. GraphPad Prism 8 (GraphPad Software) Abschnitt 6 oder Excel 2016 analysiert. Alle Daten stellen einzelne Messungen oder Mittelwerte einzelner Messungen dar und werden als Mittelwert ± SEM von n einzelnen Zellen dargestellt. Die Anzahl der Messungen pro Bedingung ist in den Legenden der Abbildungen mit n = x angegeben. Für den Vergleich zweier Mittelwerte wurde zunächst geprüft, ob die gemessenen Werte eine Gaußverteilung aufwiesen. Im Folgenden wurde ein geeigneter statistischer Test mit GraphPad Prism 7 bzw. 8 durchgeführt, bei dem neben der Gauß Verteilung auch beachtet wurde, ob 2 oder mehr Werte miteinander verglichen wurden und ob die Werte voneinander abhängig waren. Die in dieser Studie zur statistischen Analyse verwendeten Tests waren: der Mann Whitney-Test, der gepaarte t-Test, der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, sowie der Kruskal-Wallis-Test

und der einseitige-ANOVA Test. Für die beiden letztgenannten wurde als Post Hoc Test der Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn $p \leq 0,05$ war.

4.2.8 Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von der stabilen Zelllinie, die IP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-1B*, die FP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-3B* und die ET_B-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 7-4B*, exprimierten, sowie von HEK293T-Zellen die EP₃-Rezeptor-mTurquoise2 transient exprimierten, *Abbildung 7-2B*, wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100; Carl Zeiss) aufgenommen, das mit einem Plan/Apo N 360/ 1.45 Ölobjektiv (Nikon) ausgestattet war. Für die transient transfizierten Zellen geschah dies zwei Tage nach Transfektion.

Als Lichtquelle dienten LEDs (precisExcite-100, 440 und 500 nm von CoolLED). Für Messungen von CFP wurde als Exzitationsfilter der 436/20 (Chroma Technology) und für Messungen von YFP wurde Dualband Exzitationsfilter 416/501 (Chroma Technology) verwendet. Für die resultierende Emission wurden ein dichroischer Spiegel (458LP; Semrock), ein Strahlenteiler (505LP, 416, 500, 582, and 657; Chroma) und Emissionsfilter (470/24, Chroma und 525/39, Semrock) verwendet. Die Bilder wurden mit einer Hochleistungs-CCD-Kamera (Diagnostic Instruments Inc) als stk Dateien mit der Visi- View software, Version 3.3.0.8 (Visitron Systems) aufgenommen. Diese Dateien wurden mit ImageJ (U.S. National Institutes of Health) geöffnet und als png-Format exportiert.

4.2.9 Aufnahme konfokaler, fluoreszenzmikroskopischer Bilder

Konfokale Bilder von der stabilen Zelllinie, die TP-Rezeptor-Sensor (*Abbildung 5-1C*), exprimierte oder transient transfizierten Zellen die PAR1-YFP oder PAR1-Linker-YFP exprimierten (*Abbildung 5-16D,E*), wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (TCS SP5; Leica) aufgenommen, das mit einem Lambda Blue X63/1.4 NA-Ölobjektiv (Leica) ausgestattet war. Für die transient transfizierten Zellen geschah dies zwei Tage nach Transfektion. Mit einem Diodenlaser wurde YFP auf der Wellenlänge von 514 nm angeregt und die YFP-Emission in einem Bereich von 525-600 nm detektiert. Die Bilder wurden mit der LAS AF-Software in einem 1024 x 1024 Pixel -Format aufgenommen, das aus 3 gemittelten Linescans bestand. Die Scan-Geschwindigkeit wurde auf 400 Hz und die Lochblende auf 1 *Airy Unit* (95,52 μm) eingestellt. Die aufgenommenen Bilder wurden als LIF-Dateien gespeichert und mit der *ImageJ-Software* als png-Format exportiert.

5 Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren

5.1 Ergebnisse

5.1.1 Untersuchung des TP-Rezeptors auf Spannungsabhängigkeit

Teilergebnisse des vorliegenden Abschnitts 5 wurde vorab, am 25.09.2019, unter dem Titel „Voltage Dependence of Prostanoid Receptors“ zur Veröffentlichung bei Molecular Pharmacology eingereicht. Am 25.01.2020 wurde das Manuskript zur Publikation angenommen.

5.1.1.1 Klonierung eines FRET basierten Thromboxan-Rezeptor-Konformations-Sensors

Um direkte Untersuchungen der Auswirkung von Änderungen der Membranspannungen auf die Liganden-induzierte Rezeptoraktivität des TP-Rezeptors durchzuführen, wurde ein TP-Rezeptor-Konformations-Sensor kloniert.

Ausgehend von dem Konstrukt TP-Rezeptor-eYFP von Anna-Lena Krett wurde das Fluorophor am C-Terminus mit mTurquoise2 ersetzt. Eine zuvor vorhandene, sich vor mTurquoise2 befindliche, BamHI Schnittstelle wurde mittels einer Punktmutation deletiert. Zwischen A232 und Q233 wurden über eine Mutagenese PCR eine BamHI und eine NheI Schnittstelle eingefügt. Mittels der eingefügten Schnittstellen zwischen A232 und Q233 wurde ein eYFP eingefügt. Die schematische Rezeptordarstellung in *Abbildung 5-1A* veranschaulicht die genaue Position des eYFPs in ICL3 des TP-Rezeptors. In *Abbildung 5-1B* befindet sich eine schematische Darstellung des konstruierten TP-Rezeptor-Sensors. Der Klonierungserfolg wurde durch Sequenzierung sichergestellt.

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe von Effectene® mit dem TP-Rezeptor-Sensor transfiziert. Es wurden stabile Zelllinien mit dem TP-Rezeptor-Sensor-Konstrukt generiert. Ein Klon wies eine für Messungen geeignete Expression und Membranlokalisation auf und konnte für weitere Messungen verwendet werden, *Abbildung 5-1C*.

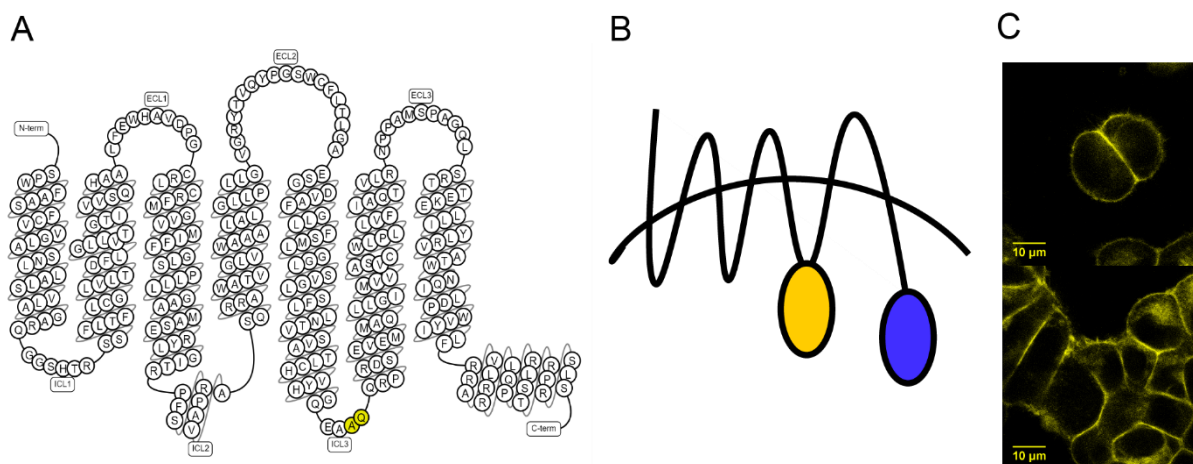


Abbildung 5-1 Klonierung eines TP-Rezeptor-Sensors (A) eYFP wurde zwischen A232 und Q233 (gelb) in ICL3 unterhalb von TM5 eingefügt. (B) Schematische Darstellung des TP-Rezeptor-Sensor, die Markierung mit mTurquoise2 erfolgte am C-Terminus (C) Konfokal mikroskopische Bilder des ausgewählten Klangs, HEK293-Zellen mit stabiler Expression des TP-Rezeptor-Sensors.

Da die endogenen TP-Rezeptor-Agonisten TXA₂ und PGH₂ instabil sind, wurde als Agonist für den TP-Rezeptor in dieser Arbeit das stabile PGH₂-Analogon U46619 verwendet, *Abbildung 5-2*.

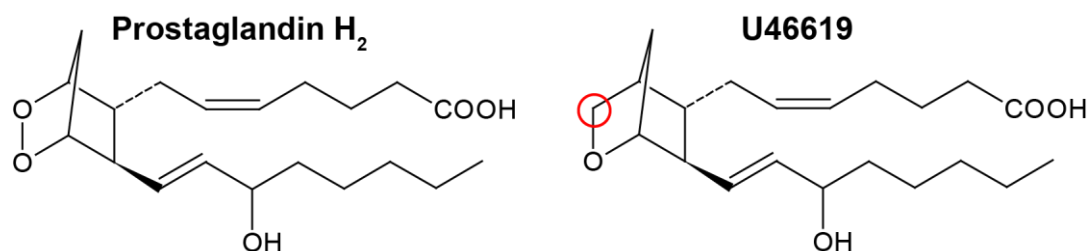


Abbildung 5-2 Vergleich von Prostaglandin H₂ und dessen stabilen Analogon U46619 Der Unterschied zwischen den beiden Liganden wurde mit einem roten Kreis hervorgehoben. An der markierten Stelle wurde das Sauerstoffatom aus PGH₂ durch ein Kohlenstoffatom ersetzt. Die zuvor vorhandene Peroxid-Gruppe wurde entfernt, wodurch die Stabilität erhöht wurde.

FRET-Experimente mit dem TP-Rezeptor-Sensor zeigten bei Stimulation mit U46619 eine Liganden-induzierte Zunahme der CFP-Emission und simultaner Abnahme der YFP-Emission, *Abbildung 5-3A* oben. Die so gegenläufigen Einzelkanal-Fluoreszenzen zeigten das Auftreten von negativem FRET an, wie es bereits für viele Rezeptor-Sensoren, die an ICL3 und C-Terminus mit Fluorophoren markiert waren, beschrieben wurde (Kauk and Hoffmann, 2018). Die Änderungen der Emissionsratio war nach Wegnahme des Agonisten reversibel, *Abbildung 5-3A* unten. Die in *Abbildung 5-3* gezeigten Graphen und alle Graphen, in denen der TP-Rezeptor-Sensor in dieser Studie gezeigt wird, wurden durch Subtraktion einer monoexponentiellen Funktion hinsichtlich des Photobleichens korrigiert, siehe auch 4.2.3.6. Die Applikation einer hohen Konzentration von U46619 führte zu einer

Änderung der Emissionsratio ausgehend von der Basislinie von $2,6 \% \pm 0,2 \%$, *Abbildung 5-3B*. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wies eine gute Qualität auf und ermöglichte eine Identifizierung selbst geringer FRET-Unterschiede. Die Liganden induzierte Änderung der Emissionsratio war konzentrationsabhängig, *Abbildung 5-3C* oben. Für TP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen, *Abbildung 5-3C* unten. Der EC_{50} lag bei 95 nM U46619.

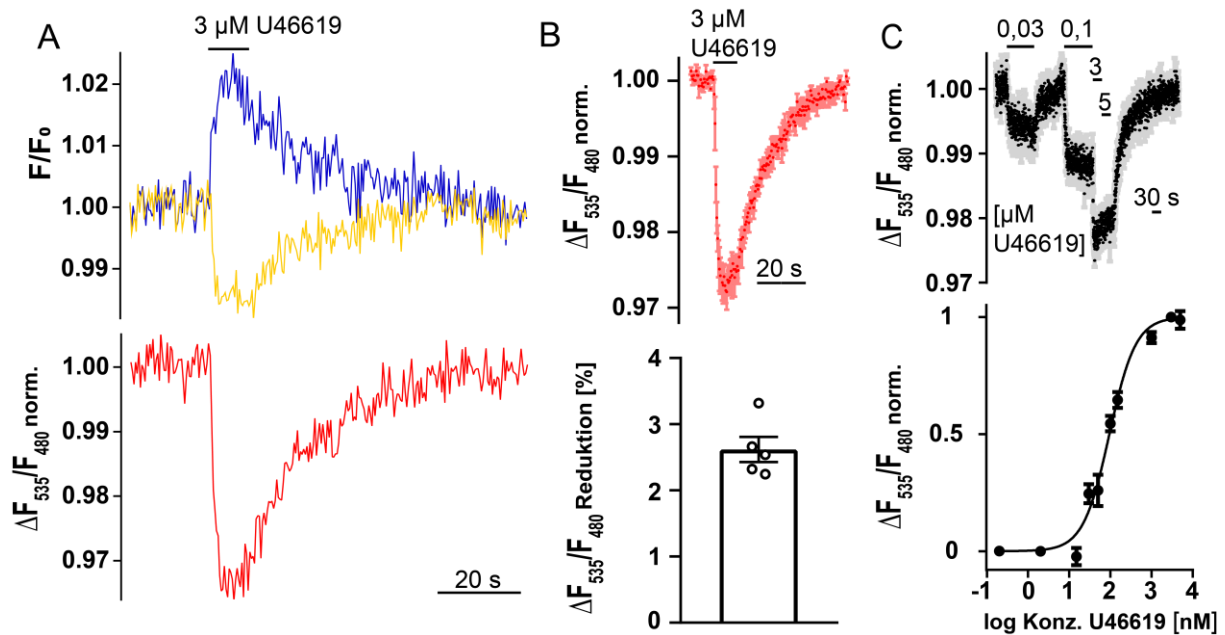


Abbildung 5-3 FRET-basierte Messungen der Agonist-vermittelten Konformationsänderung am TP-Rezeptor-Sensor In allen Abbildungen zeigt ein schwarzer Balken über den Messungen die Dauer und die Bezeichnung darüber die Konzentration des applizierten Agonisten an. In Abbildungen, die Einzelkanal-Messungen zeigen, entsprechen die blauen und gelben Spuren der Emissionsintensität des Donors (F_{480}) bzw. des Akzeptors (F_{535}). (A) Die Emission von CFP und YFP einer Einzelzelle, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierte, wurden aufgezeichnet. Es wurden 3 μM U46619 appliziert, das auftretende Photobleichen korrigiert und die Einzelkanal-Fluoreszenzen in den entsprechenden Farben dargestellt. Es handelt sich um eine repräsentative Messung (von $n = 5$). Die entsprechende Emissionsratio, normiert auf Initialwerte, ist rot dargestellt. (B) Oben: Mittelwerte \pm SEM von Messungen, ähnlich zu den in (A) unten gezeigten. (B) Unten: Prozentuale Änderung der Emissionsratio des TP-Rezeptor-Sensors ausgehend von der Basislinie ($2,6 \% \pm 0,2 \%$). (C) Oben: HEK 293T-Zellen, die transient den TP-Rezeptor-Sensor exprimierten, wurden mit verschiedenen Konzentrationen von U46619 aktiviert, die Emissionsratio wurde auf die Initialwerte normalisiert ($n = 6$; Mittelwerte \pm SEM). (C) Unten: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für HEK293T-Zellen, die transient den TP-Rezeptor-Sensor exprimierten ($EC_{50} = 95 \text{ nM}$ U46619). Die Messungen erfolgten, ähnlich zu den in (C) oben gezeigten. Es wurde normalisiert auf die durch 3 μM U46619 hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle (Mittelwerte \pm SEM $n = 4\text{--}16$ Zellen pro Datenpunkt).

5.1.2 Die Liganden induzierte Aktivierung des TP-Rezeptors wird durch Depolarisation im physiologischen Bereich des V_M potenziert

Um die Wirkung der Membranspannung auf die TP-Rezeptor-Aktivität zu untersuchen, wurde FRET unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung mittels *Patch-Clamp* Technik in HEK293-Zellen gemessen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten. Der TP-Rezeptor wurde mit 100 nM U46619, einer nicht sättigenden Konzentration des Agonisten, bei einem Haltepotential von -90 mV aktiviert. Nachdem ein Equilibrium erreicht wurde, wurden die Zellen auf +60 mV geklemmt. Diese Depolarisation führte zu einer Abnahme der Emissionsratio, was eine Rezeptoraktivierung bei der Depolarisation widerspiegelt. Dieser Effekt war bei Repolarisation auf -90 mV reversibel, *Abbildung 5-4A*. Im Gegensatz dazu wurde in Abwesenheit eines Agonisten keine Änderung der Emissionsratio des TP-Rezeptor-Sensors durch eine Depolarisation beobachtet, *Abbildung 5-4B*. Um herauszufinden, ob die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors in einem physiologischen Bereich von V_M auftritt, wurde das Verhältnis von Rezeptoraktivität und V_M mit einer nicht sättigenden Konzentration des Agonisten gemessen. Die Werte wurden auf die Werte normiert, die bei 0 mV erhalten wurden. Durch die normierten Werte konnten Boltzmann-Kurven für 50 und 200 nM U46619 ermittelt werden. Anhand der Boltzmann-Kurve für 50 nM U46619 wurde ein $V_{0,5}$ von -46 mV ermittelt, *Abbildung 5-4C*. Die Boltzmann-Kurve für 200 nM U46619, wies ein kleineres Messfenster auf. Da die Werte bereits ab 0 mV in die Sättigung liefen und somit den Verlauf des Spannungseffektes nur begrenzt wiedergaben, wurde der z-Wert nur für die Kurve von 50 nM U46619 berechnet. Der z-Wert betrug 0,5 Elementarladungen.

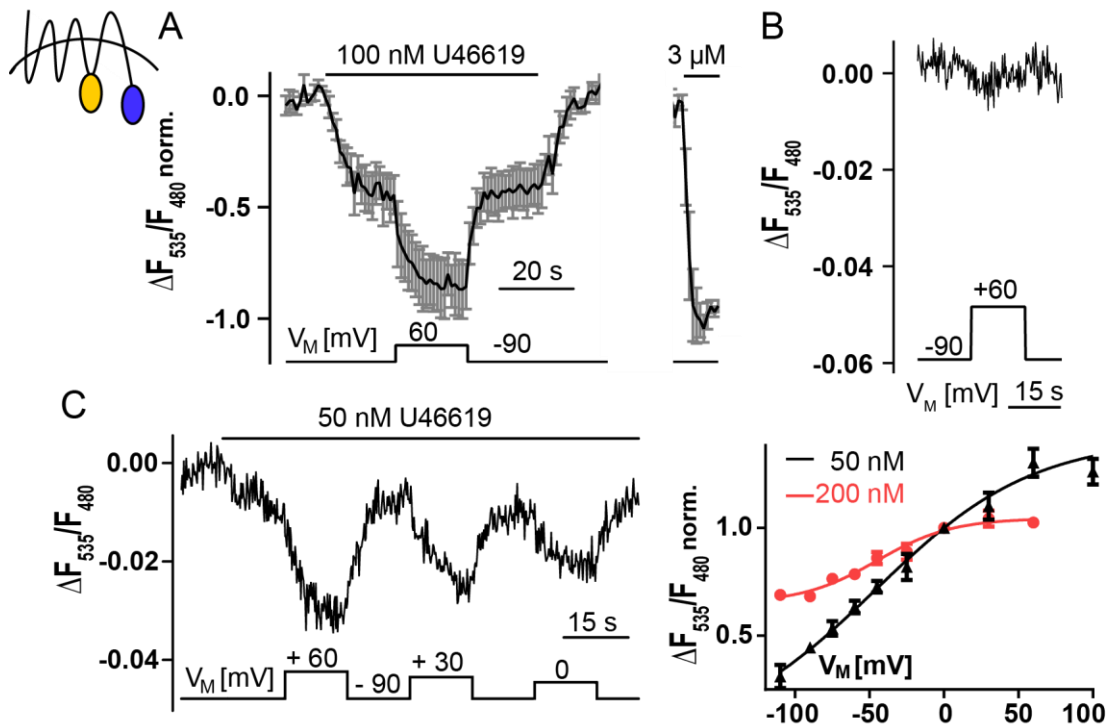


Abbildung 5-4 Membrandepolarisation erhöht die Aktivität des TP-Rezeptors In allen Abbildungen, die Messungen enthalten, bei denen Zellen unter kontrollierter Membranspannung gemessen wurden, wird das Membranpotential als schwarze Linie unter den Graphen angezeigt. (A) HEK293-Zellen, die stabil den TP-Rezeptor-Sensor exprimierten, wurden mit 100 nM U46619 bei -90 mV stimuliert. Anschließend wurden die Zellen wie angegeben für 20 s auf +60 mV depolarisiert. Nach dem Auswaschen des Agonisten und Relaxation des Rezeptorsignals wurde eine hohe Konzentration von 3 μ M U46619 appliziert. Auf die durch diese Konzentration hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle normalisiert wurde ($n = 5$; Mittelwerte \pm SEM). (B) Messungen wie in (A) in Abwesenheit von Agonist. Es erfolgte für 15 s eine Depolarisation von -90 mV auf +60 mV (Repräsentative Messung von $n = 6$). (C) Links: Repräsentative Messung und (E) zeigen die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptor-Sensors für die jeweils angegebenen Spannungen an. Als Bezugspotential wurden immer 0 mV und -90 mV eingeschlossen. Rechts: Gemittelte Daten (50 nM U46619, schwarz; $n = 5-15$; 200 nM U46619, rot; $n = 8-15$; Zellen pro Datenpunkt; Angegeben sind jeweils Mittelwerte \pm SEM) der spannungsinduzierten Änderungen der Emissionsratio. Die Normierung der Werte erfolgte auf die Werte, die bei 0 mV erhalten wurden. Für diese Daten wurde jeweils eine Boltzmann-Funktion berechnet und gezeichnet, wodurch sich folgende Werte ergaben: $V_{0,5}$ (50 nM U46619) = -46 mV; $V_{0,5}$ (200 nM U46619) = -45 mV.

5.1.3 Der Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor wird auf G-Protein- und Effektor-Ebene weitergegeben

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich der am TP-Rezeptor-Sensor beobachtete Spannungseffekt auf die nachfolgende Signalübertragung des TP-Rezeptors ausbreitet. Für die Untersuchung wurde, wie bereits im vorangegangenen Kapitel mit einer Kombination von FRET-Messungen und *Patch-Clamp* gearbeitet. Der TP-Rezeptor koppelt hauptsächlich an $G\alpha_q$ und $G\alpha_{13}$ (Nakahata, 2008). Die

Spannungsabhängigkeit der TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion wurde untersucht, *Abbildung 5-5A*. Im Anschluss an die Interaktion eines GPCRs mit einem G-Protein folgt die G-Protein-Aktivierung, weshalb es interessant gewesen wäre die Spannungsabhängigkeit der $G\alpha_{13}$ -Aktivierung zu messen. Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der $G\alpha_{13}$ -Aktivierung war allerdings nicht ohne weiteres möglich, da es bei der $G\alpha_{13}$ -Aktivierung in HEK293T-Zellen, aufgrund des endogenen LARGs, einem Mitglied der RhoGEF-Familie, zu einem transienten Signal kommt (Bodmann *et al.*, 2017). Mittels FRET-Assays war es möglich die Interaktion des aktivierten $G\alpha_{13}$ mit verschiedenen Effektoren in Echtzeit zu untersuchen. Wir entschieden uns die TP-Rezeptor-induzierte Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115, einem Effektor von $G\alpha_{13}$, der ebenfalls aus RhoGEF-Familie stammt, auf Spannungsabhängigkeit zu untersuchen, *Abbildung 5-5B*. Beide FRET-Assay, der TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktions-Assay und der $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bünemann von Anna-Lena Krett entwickelt und sind in der Masterarbeit publiziert (Krett, 2015). Wir beobachteten eine Aktivierung bei Depolarisation, die mit der für den TP-Rezeptor-Sensor beobachteten im Einklang stand. Weiterhin wurde untersucht, ob sich der Spannungseffekt auch auf $G\alpha_q$ -vermittelte Signalwege auswirkt. Die Stellen, an denen das Fluorophor in das G-Protein eingefügt wurde, variieren zwischen $G\alpha_{13}$ (Bodmann *et al.*, 2017) und $G\alpha_q$ (Hughes *et al.*, 2001). Die FRET Interaktion zwischen TP-Rezeptor und $G\alpha_q$ wies eine wesentlich geringere Amplitude, als die Interaktion zwischen TP-Rezeptor und $G\alpha_{13}$ auf (Daten nicht gezeigt). Daher erfolgte keine Untersuchung der Spannungsabhängigkeit mit diesem Assay. Stattdessen erfolgte eine Untersuchung des Effektes auf die $G\alpha_q$ -Aktivierung durch TP-Rezeptor. Das zur Messung der $G\alpha_q$ -Aktivierung verwendete FRET-Assay enthielt mit Fluorophoren markiertes $G\alpha_q$ und $G\beta$, ähnlich wie in (Hoffmann *et al.*, 2012) mit $G\alpha_q$ und $G\gamma$ beschrieben. Der TP-Rezeptor wurde zusammen mit dem $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay transient transfiziert. Depolarisation in Anwesenheit des Agonisten führte zu einer Abnahme der Emissionsratio, was eine Rezeptoraktivierung bei der Depolarisation auch im $G\alpha_q$ -Assay widerspiegelte, *Abbildung 5-5C*. Hervorzuheben ist hier, dass sowohl der im $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay verwendete, als auch der im $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay verwendete TP-Rezeptor ein Wildtyp (wt)-Rezeptor war und nicht mit einem Fluorophor markiert oder in irgendeiner anderen Form modifiziert war. Die Größe des Spannungseffektes zwischen den getesteten Assay wies keine signifikanten Unterschiede auf, *Abbildung 5-5D*. In Abwesenheit von Agonisten konnte für die TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion, *Abbildung 5-5E* und die TP-Rezeptor-induzierte Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115, *Abbildung 5-5F*, keine Aktivierung durch Depolarisation beobachtet werden.

Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren

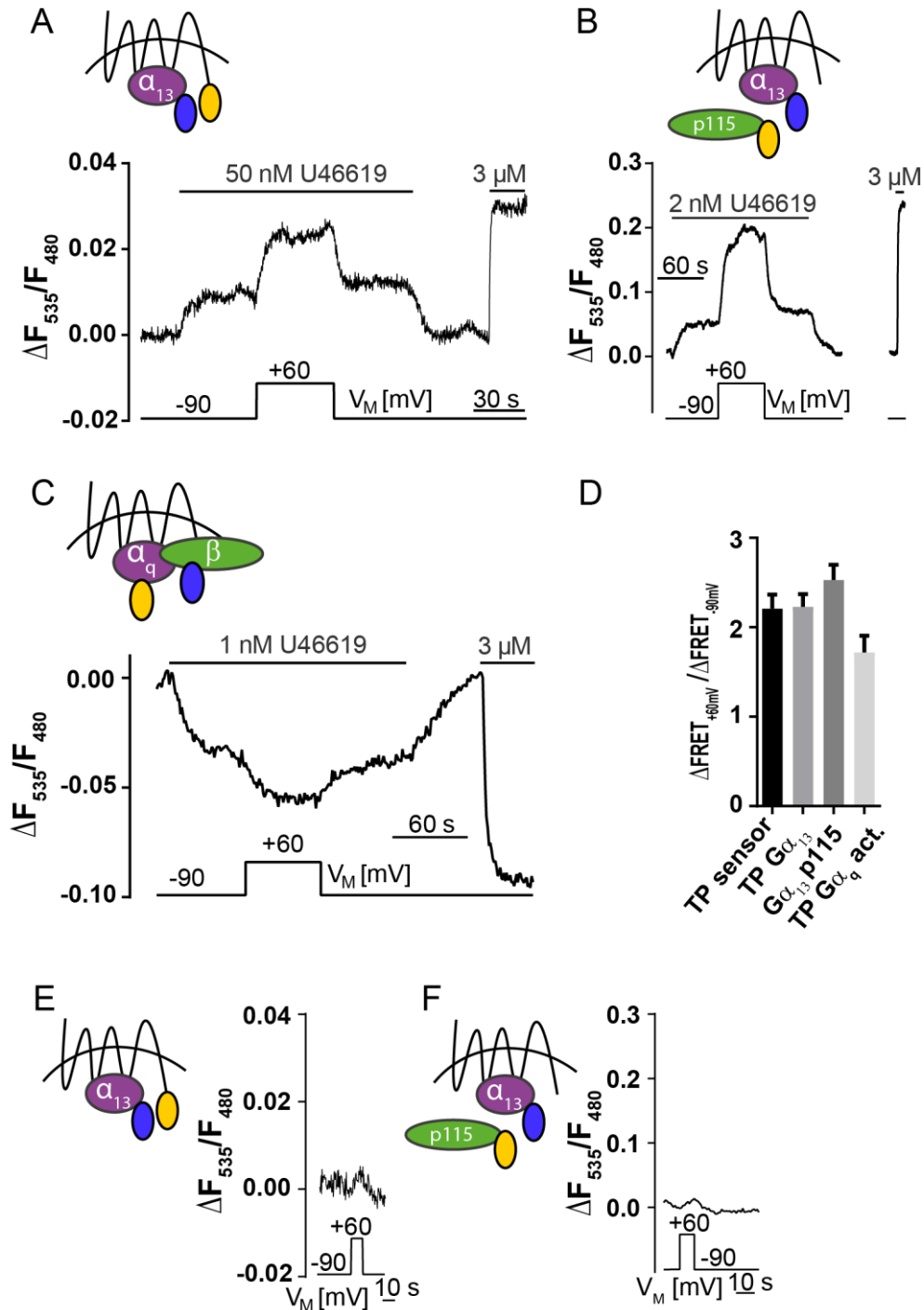


Abbildung 5-5 Ausbreitung des Spannungseffekts auf die dem TP-Rezeptors nachgeschalteten Signalmoleküle. Mit dem jeweils angegebenen FRET-basierten Biosensor transfizierte Zellen für (A) TP-Rezeptor- G_{13} -Interaktion (repräsentative Messung von $n = 3$) und (B) TP-Rezeptor-induzierter G_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion (repräsentative Messung von $n = 7$) und (C) TP-Rezeptor G_{13} -Aktivierungs-Assay (repräsentative Messung von $n = 5$) wurden, unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung, FRET-Einzelzell-Messungen durchgeführt. (D) Die gemessenen $\Delta F_{535}/F_{480}$ Werte bei +60 mV in Gegenwart von U46619 wurden durch Werte von $\Delta F_{535}/F_{480}$ bei -90 mV, in Anwesenheit der gleichen Konzentration des Agonisten, geteilt; Die Werte für TP-Rezeptor-Sensor, TP-Rezeptor- G_{13} , G_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor G_{13} -Aktivierung wurden verglichen: Es konnte

kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Analyse mit Kruskal-Wallis-Test, p -Wert = 0,10; Mittelwerte \pm SEM; TP-Rezeptor-Sensor = $2,21 \pm 0,16$, $n = 29$; TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ = $2,23 \pm 0,14$, $n = 3$; und $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion = $2,53 \pm 0,17$, $n = 15$; $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay = $1,72 \pm 0,19$, $n = 5$). (E) Messungen wie in (A) in Abwesenheit von Agonist. Für 10 s erfolgte eine Depolarisation von -90 mV auf +60 mV (Repräsentative Messung von $n = 6$) (F) Messungen wie in (B) in Abwesenheit von Agonist, für 10 s erfolgte eine Depolarisation von -90 mV auf +60 mV (Repräsentative Messung von $n = 12$).

5.1.4 Spannungseffekt auf die Affinität des TP-Rezeptors

Der beobachtete Anstieg der TP-Rezeptor-Aktivität bei Depolarisation könnte theoretisch durch einen Spannungseffekt auf die intrinsische Aktivität oder Affinität des Agonisten oder einer Mischung aus beiden zurückzuführen sein. Um dies zu untersuchen, haben wir Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den TP-Rezeptor-Sensor mit U46619 bei -90 mV und bei +60 mV gemessen. Der EC_{50} bei Depolarisation auf +60 mV war ungefähr 4,5-fach niedriger als der EC_{50} bei -90 mV, *Abbildung 5-6A*.

Bei sättigenden Konzentrationen des Agonisten können sich durch Depolarisation hervorgerufene Änderungen der intrinsischen Aktivität, nicht jedoch Änderungen der Affinität auf die Rezeptoraktivität auswirken. Wir applizierten 3 μ M U46619, entsprechend der Konzentrations-Wirkungs-Kurve einer sättigenden Konzentration des Agonisten, *Abbildung 5-3B* unten. Unter diesen Bedingungen waren am TP-Rezeptor-Sensor keine spannungsinduzierten FRET-Änderungen nachweisbar, *Abbildung 5-6B*. Auf der Ebene der TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion war bei Depolarisation eine kleine transiente FRET-Änderung sichtbar, *Abbildung 5-6C*. Um dies auch für die TP-Rezeptor-GRK2-Interaktion zu untersuchen, wurde zunächst eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen. Diese ergab einen EC_{50} von 26 nM, *Abbildung 5-6D*. Für die TP-Rezeptor-GRK2-Interaktion konnten wir bei Gabe einer sättigenden Konzentration des Agonisten ebenfalls keine weitere Rezeptoraktivierung durch Depolarisation beobachten, *Abbildung 5-6E*. Dies spricht dafür, dass die Spannung in erster Linie die Affinität von Agonisten zu dem TP-Rezeptor reguliert.

Der dritte Aspekt, den wir in diesem Zusammenhang untersuchten, war die Kinetik. Wenn Spannungsänderungen zu einem Unterschied in der Affinität führen, würde dies eine Bindung des Agonisten erfordern. Daher wäre die Kinetik dieses Effekts von der Geschwindigkeit der Bindung des Agonisten und damit unter anderem von der Diffusionsgeschwindigkeit abhängig. Wir verglichen die Kinetik der Rezeptoraktivierung bei Depolarisation in Gegenwart von entweder 50 oder 200 nM U46619 und beobachteten eine signifikant höhere Geschwindigkeit der durch Depolarisation induzierten Rezeptor-Aktivierung für die höhere Konzentration des Agonisten, *Abbildung 5-6F*. Weiterhin wurde die Geschwindigkeit der Rezeptor-Deaktivierung induziert durch Depolarisation mit der Deaktivierung durch Auswaschen des Agonisten mit Puffer verglichen. Im Falle einer Affinitätsänderung würden beide Prozesse mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen. Zu unserer Überraschung war die

Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren

spannungsinduzierte Deaktivierungskinetik etwa dreimal so schnell wie die beim Auswaschen beobachtete Geschwindigkeit, *Abbildung 5-6G*, was möglicherweise auf eine erneute Bindung des lipophilen Liganden in der Plasmamembran zurückzuführen ist.

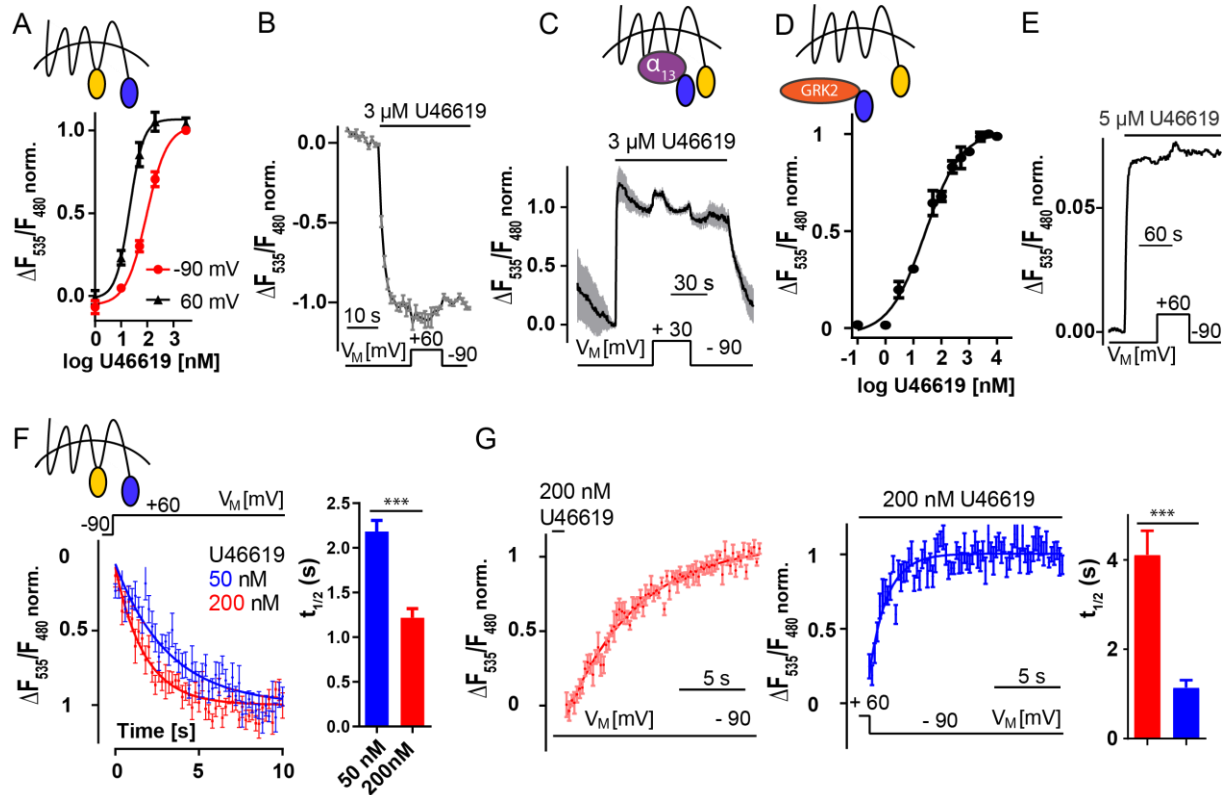


Abbildung 5-6 Spannungseffekt auf die U46619-vermittelte Aktivierung des TP-Rezeptor-Sensors. (A) Konzentrations-Wirkungs-Kurven des TP-Rezeptor-Sensors die bei -90 mV ($EC_{50} = 93$ nM) bzw. bei +60 mV ($EC_{50} = 21$ nM) gemessen wurden ($n = 7-15$ pro Datenpunkt). Alle Amplituden von durch Agonisten hervorgerufenen Abnahmen in der Emissionsratio wurden auf die Amplitude einer Referenzkonzentration (3 μ M U46619 bei -90 mV) normiert. (B) Spannungseffekt auf die TP-Rezeptor-Sensor-Aktivität (Mittelwerte \pm SEM, $n = 6$), (C) die TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$) in Gegenwart einer sättigenden Konzentration des Agonisten von U46619. (D) Mit Zellen, die mit dem FRET-basierten Biosensor für das TP-Rezeptor-GRK2-Interaktions-Assay transfiziert waren, wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen. Normalisiert wurden die Signale auf die durch 5 μ M U46619 hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle (Mittelwerte \pm SEM für die getesteten Konzentrationen, $n = 3$ Zellen pro Datenpunkt, $EC_{50} = 26$ nM). (E) Die TP-GRK2 Interaktion (Repräsentative Messung von $n = 3$) wurde als Antwort auf die Applikation einer sättigenden Konzentration von U46619 gemessen. (F) Mittelwert \pm SEM des zeitlichen Verlaufs der TP-Rezeptor-Sensor-Aktivierung bei Depolarisation von -90 auf +60 mV in Gegenwart von U46619 (50 nM (blau): $n = 7$, 200 nM (rot) $n = 15$). Links: Mittelwert \pm SEM. Anhand der Daten wurde eine exponentielle Funktion gefittet. Rechts: Die anhand der gefitteten Funktionen einzelner Experimente bestimmten $t_{0,5}$ -Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($t_{0,5}$ (50 nM) = $2,2$ s \pm $0,1$ s, $t_{0,5}$ (200 nM) = $1,2$ s \pm $0,1$ s; *** $p = 0,0001$, Mann-Whitney-Test). (G) Mittelwerte \pm SEM des zeitlichen Verlaufs der TP-Rezeptor-Sensor-Deaktivierung, gemessen mit gepatchten HEK293-Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil

exprimierten. Die Rezeptor-Deaktivierung wurde ausgelöst durch links: Ausspülen von 200 nM U46619 bei -90 mV ($n = 11$ (rot)); Mitte: Repolarisation von -90 auf +60 mV in Gegenwart von U46619 (200 nM (blau) $n = 10$). Anhand der gemittelten Daten wurden monoexponentielle Funktionen gefittet. Rechts: die durch fitten einzelner Experimente ermittelten $t_{0,5}$ -Werte sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($t_{0,5}$ (Ausspülen) = $4,1 \text{ s} \pm 0,5 \text{ s}$, $t_{0,5}$ (Deaktivierung durch Hyperpolarisation) = $1,1 \text{ s} \pm 0,2 \text{ s}$; *** $p = 0,0004$ Mann-Whitney-Test).

5.1.5 Die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors hängt nicht von bestimmten funktionellen Gruppen des Agonisten ab

Prostanoide weisen eine sehr konservierte Struktur auf. Daher wurde ein systematischer Test von Prostanoiden-Liganden, die an einer oder mehreren Positionen substituiert waren und sich von U46619 unterschieden, durchgeführt. Ziel war es herauszufinden, welche Position(en) ausschlaggebend für die beobachtete Spannungsabhängigkeit des mit U46619 aktivierten TP-Rezeptors waren. U46619 als prostanoidartiger Ligand besteht aus einer α -Kette und einer ω -Kette, die an einen zentralen Ring gebunden sind, vergleiche *Abbildung 3-6*.

Substituierte Liganden wurden hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit entweder mit dem TP-Rezeptor-Sensor-Assay (hier führt eine Zunahme der Rezeptoraktivität zu einer Abnahme der Emissionsratio) oder mit der TP-Rezeptor-induzierten $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion getestet (hier führt eine Zunahme der Rezeptoraktivität zu einer Zunahme der Emissionsratio). Der TP-Rezeptor-induzierte $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay verfügt über ein sehr robustes Signal und weist eine Amplifikation auf, die es ermöglicht auch Agonisten mit geringer intrinsischer Aktivität zu testen. Die Strukturen der getesteten Liganden sind in *Abbildung 5-7A* gezeigt. Folgende Liganden (der markante Unterschied zu U46619 wurde jeweils in Klammern beschrieben) wurden getestet: I-BOP (Unterschied in der Ringstruktur und der lipophileren ω -Kette), *Abbildung 5-7B*, 15-Keto-PGE₂, *Abbildung 5-7C* und 15 (S)-15-Methyl-PGE₂, *Abbildung 5-7D* (PGE₂-ähnliche Ringstruktur und substituiert an der Hydroxylgruppe an Position 15), PGE₂-Ethanolamid, *Abbildung 5-7E* und PGE₂-Methylester, *Abbildung 5-7F* (PGE₂-ähnliche Ringstruktur und substituierte C1-Position, somit Ladung an Carbonsäure entfernt), 8-iso-PGE₂, *Abbildung 5-7G* (PGE₂-ähnliche Ringstruktur und chirale Inversion an C8), 8-iso-PGE₁, *Abbildung 5-7H* (wie 8-iso-PGE₂, jedoch ohne Doppelbindung zwischen Position 5 und 6). Der mit einem der Liganden aktivierte TP-Rezeptor zeigte in jedem Fall eine robuste Aktivierung bei Depolarisation, wie sie zuvor bei einer Aktivierung durch U46619 beobachtet wurde. In der Tabelle in *Abbildung 5-7I* sind die Quantifizierungen der gemessenen Aktivierungen durch Depolarisation aufgeführt.

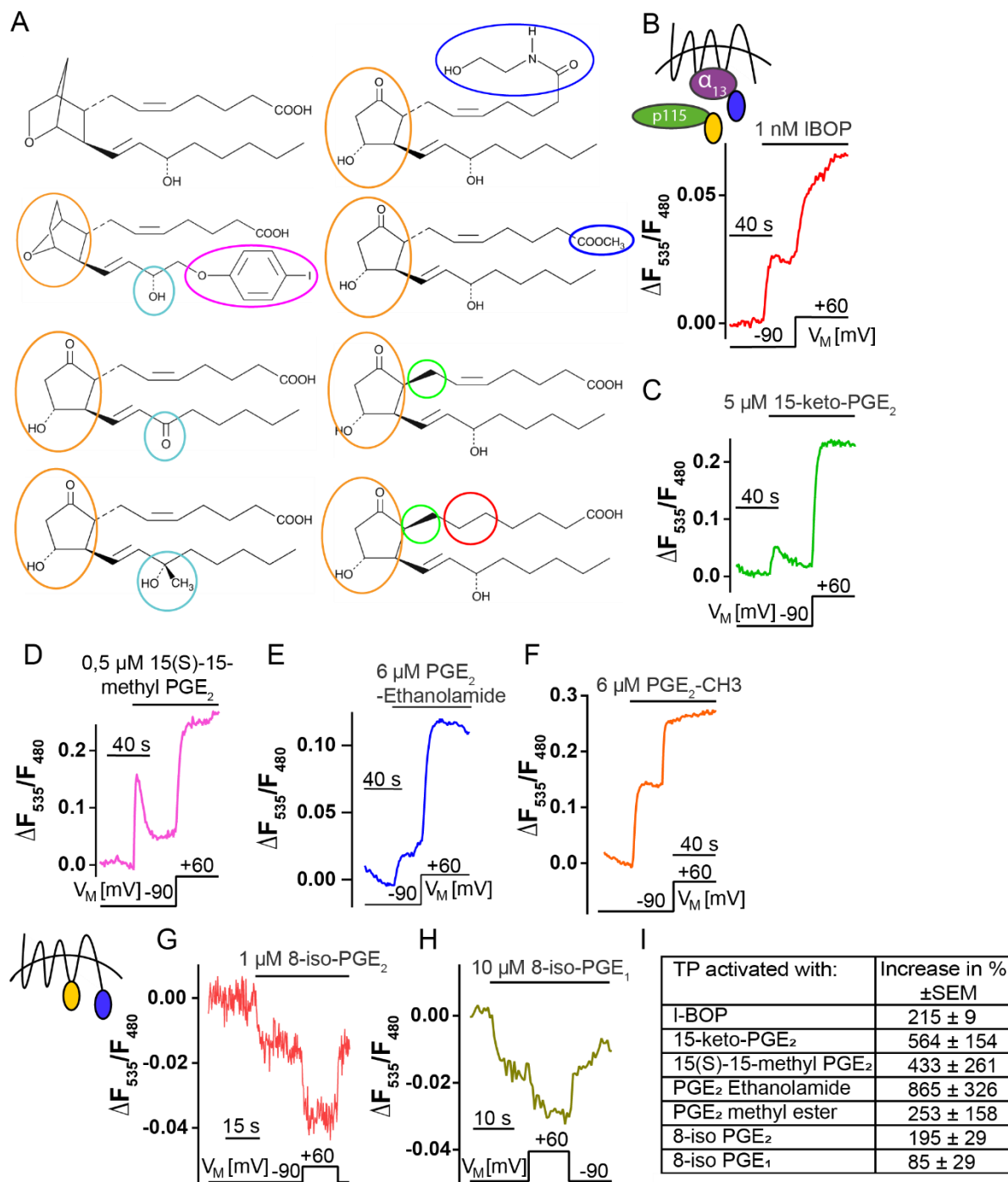


Abbildung 5-7 Spannungseffekt auf den aktivierten TP-Rezeptor mit U46619-Analoga. (A) Strukturen getesteter U46619-Analoga (von Cayman Chemicals; <https://www.caymanchem.com/>). Links von oben nach unten: U46619, I BOP, 15-Keto-PGE₂, 15 (S) -15-Methyl-PGE₂. Rechts von oben nach unten: PGE₂-Ethanolamid, PGE₂-Methylester, 8-iso PGE₂, 8-iso PGE₁. FRET Messungen unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die Ga₁₃-p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert und mit folgendem Liganden aktiviert wurden: (B) I-BOP (n = 3); (C) 15-Keto-PGE₂ (n = 3); (D) 15-(S)-15-Methyl-PGE₂ (n = 3); (E) PGE₂-Ethanolamid (n = 3); (F) PGE₂-methylester (n = 5); Mit TP-Rezeptor-Sensor-Assay getestete

Liganden: (G) 8-iso-PGE₂ (n = 16); (H) 8-iso-PGE₁ (n = 3); (I) Mittelwerte ± SEM. Die gemessenen $\Delta F_{535}/F_{480}$ Werte bei +60 mV in Gegenwart des angegebenen Liganden wurden durch Werte von $\Delta F_{535}/F_{480}$ bei -90 mV, in Anwesenheit der gleichen Konzentration, geteilt. Es ist zu beachten, dass die relativ starken Unterschiede in der Aktivierung des TP-Rezeptors durch Depolarisation wahrscheinlich auf Unterschiede in der initialen Reaktion auf die getesteten Liganden bei -90 mV zurückzuführen sind und nicht zwangsläufig echte Unterschiede in der Stärke des Spannungseffekts widerspiegeln.

5.1.6 8-iso PGE₂: Affinitätszunahme bei Depolarisation

Neben verschiedenen Prostanoiden können auch die nicht-enzymatisch gebildeten Isoprostaglandine den TP-Rezeptor aktivieren (Milne *et al.*, 2014). Nachdem für den durch 8-iso PGE₁, *Abbildung 5-7H*, bzw. 8-iso PGE₂, *Abbildung 5-7G*, aktivierten TP-Rezeptor eine Depolarisation eine Rezeptor-Aktivierung bewirkte, war es von Interesse zu erfahren, ob auch hier die Spannungsabhängigkeit ihren Effekt im Wesentlichen auf die Affinität ausübte. Hierfür wurden zunächst Konzentrations-Wirkungs-Kurven für 8-iso PGE₁ und 8-iso PGE₂ im TP-Rezeptor-Sensor- und TP-Rezeptor-induzierten Gα₁₃-p115-RhoGEF-Interaktions-Assay gemessen, *Abbildung 5-8A*. Bei letzterem lag der gemessene EC₅₀ mit 22 nM für 8-iso PGE₁ in etwa doppelt so hoch, wie der für 8-iso PGE₂ gemessene Wert (EC₅₀ = 11 nM), *Abbildung 5-8A*. Am TP-Rezeptor-Sensor wurde ein EC₅₀ für 8-iso PGE₂ von 1283 nM ermittelt, *Abbildung 5-8A*. Für 8-iso PGE₁ konnte am TP-Rezeptor-Sensor kein EC₅₀ ermittelt werden, da die Werte im messbaren Bereich keine Sättigung erreichten, *Abbildung 5-8A*. Aus diesem Grund konnte nur eine weitere Untersuchung von 8-iso PGE₂ auf die Qualität des Spannungseffektes erfolgen. Es zeigte sich, dass in einer zumindest weitestgehend sättigenden Konzentration von 10 μM 8-iso PGE₂ nur noch eine marginale Aktivierung durch Depolarisation beobachtet werden konnte, *Abbildung 5-8B*. Bei einer Konzentration im Bereich des EC₅₀ von 1 μM 8-iso PGE₂ kam es zu einer Zunahme von etwa 195%, siehe *Abbildung 5-7I*.

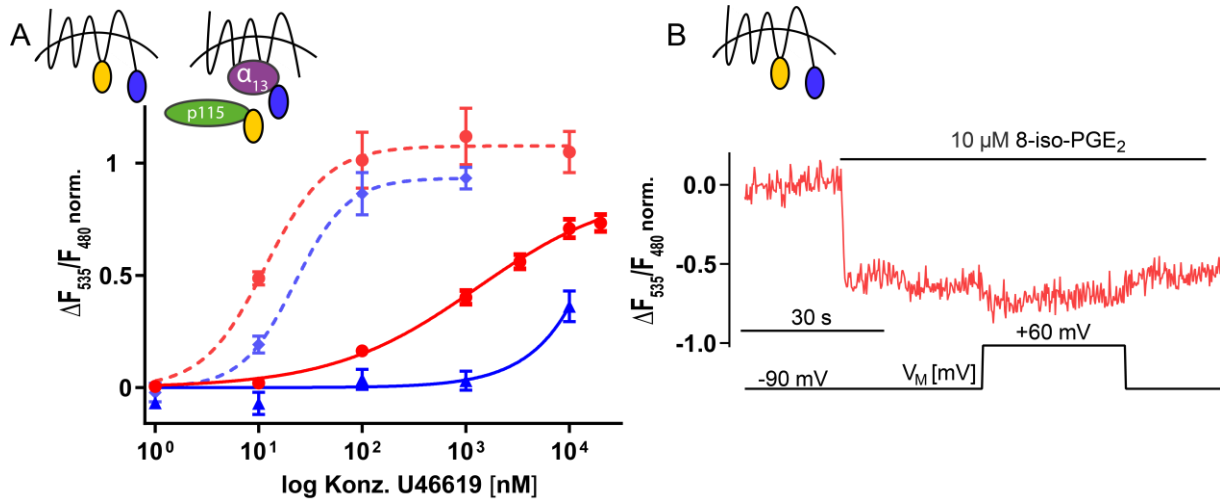


Abbildung 5-8 Spannungseffekt auf Affinität 8-iso PGE₂ für den TP-Rezeptor Die Werte wurden normalisiert auf die durch 5 μ M U46619 hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle (Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM). (A) Dargestellt sind Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die mit dem TP-Rezeptor-Sensor Assay für 8-iso PGE₁ (blau, durchgängige Linie; $n = 2-3$) und 8-iso PGE₂ (rot, durchgängige Linie; $n = 6-15$) gemessen wurden, sowie Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die mit dem TP-Rezeptor-induzierten G_{i13} -p115-RhoGEF-Interaktions-Assay für 8-iso PGE₁ (blau, gestrichelte Linie; $n = 2-5$) und 8-iso PGE₂ (rot, gestrichelte Linie; $n = 3$) gemessen wurden. (B) Der Spannungseffekt auf die TP-Rezeptor-Sensor-Aktivität bei Aktivierung mit 10 μ M 8-iso PGE₂ wurde gemessen und hier dargestellt als repräsentative Messung aus $n = 5$ vergleichbaren Einzelzellmessungen.

5.1.7 Mutationen an R295^{7,40} verändern den Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor

Da wir keine wichtigen Kontakte zwischen Ligand und Rezeptor durch Testung verschieden substituierter Agonisten identifizieren konnten, mutierten wir Aminosäuren, von denen bekannt war, dass sie am Prozess der Bindung des Liganden an den TP-Rezeptor beteiligt sind (Funk *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1996; D'Angelo *et al.*, 1996; Khasawneh *et al.*, 2006) mit dem Ziel, den Modus der Ligandenbindung zu ändern, *Abbildung 5-9A*. Aus der Literatur war bekannt, dass der Agonisten-Bindungsmodus entscheidend für die Auswirkung der Spannung auf die GPCR-Aktivität sein kann (Rinne *et al.*, 2015). Hierbei handelte es sich um TP-Rezeptor-Mutanten: S201^{5,44}T (Hochgestellte Zahlen zeigen die Nummerierung der bezeichneten Aminosäure unter Verwendung der Ballesteros-Weinstein-Nomenklatur an (Ballesteros and Weinstein, 1995)), S255^{6,45}T, W299^{7,44}L und D193^{5,36}E und R295^{7,40}K. TP-Rezeptor-Mutanten S201^{5,44}T, S255^{6,45}T, W299^{7,44}L und D193^{5,36}E zeigten ein Wildtyp-ähnliches Verhalten in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit, *Abbildung 5-9B-E*.

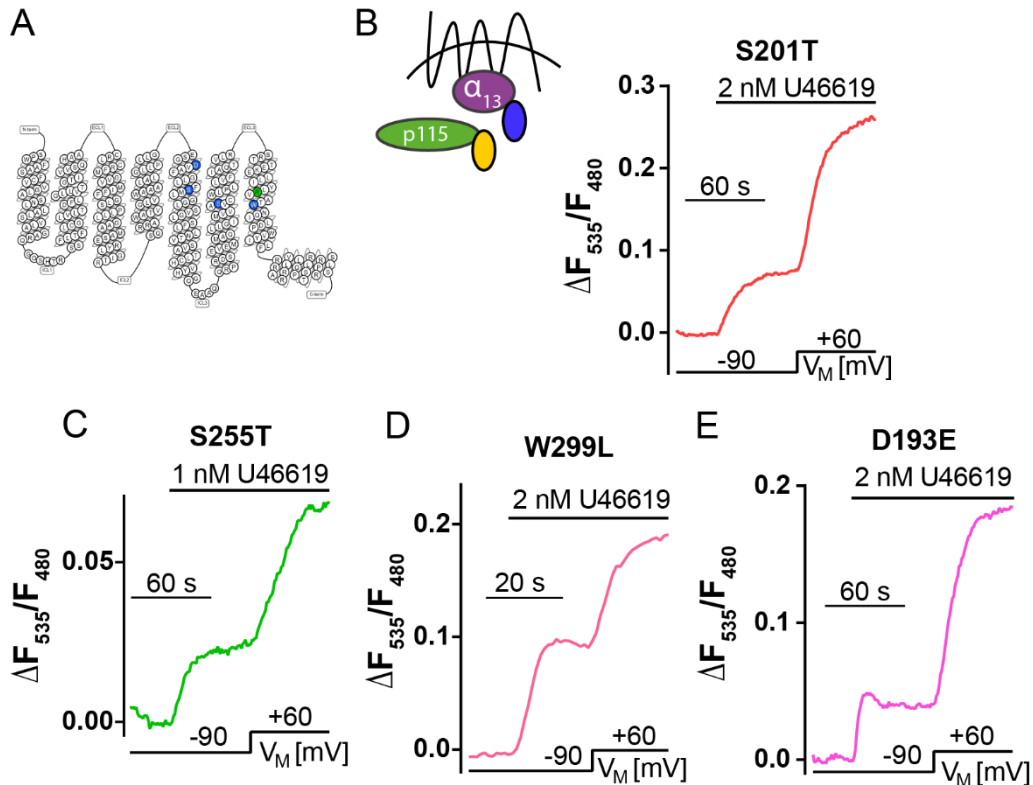


Abbildung 5-9 Spannungsabhängigkeit verschiedener an der Ligandenbindung beteiligter TP-Rezeptor-Mutanten (A) Ein Snakeplot des TP-Rezeptors wurde mit Hilfe von GPCRdb.org erstellt, die Positionen mutierter Aminosäuren sind in Blau bis auf R^{7.40}295 in Grün dargestellt. (B) - (E): FRET-Messungen unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und der jeweils angegebenen TP-Rezeptor-Mutante transfiziert wurden. Es handelt sich jeweils um repräsentative Messungen von jeweils $n = 3$ vergleichbaren Einzelzellmessungen der TP-Rezeptor-Mutante S201^{5.44}T (B), TP-Rezeptor-Mutante S255^{6.45}T (C), TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L (D) und der TP-Rezeptor-Mutante D193^{5.36}E (E).

Während das Projekt bereits in Bearbeitung war, wurden zwei Kristallstruktur des an Antagonisten gebundenen TP-Rezeptors publiziert (Fan *et al.*, 2019). Diese Strukturen bestätigten die durch vorangegangenen Untersuchungen vorhergesagte direkte Interaktion von R295^{7.40} mit der Carboxylgruppe des Liganden (Fan *et al.*, 2019), *Abbildung 5-10A*. Wir mutierten das Arginin in Position 295^{7.40} zunächst zu einem Lysin.

Die TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K zeigte eine Liganden induzierte Rezeptoraktivierung (in Übereinstimmung mit der Literatur (Tai *et al.*, 1997) und wies einen um etwa zwei Größenordnungen nach rechts verschobenen EC₅₀ auf (von 2 nM auf 415 nM), *Abbildung 5-10B*. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die TP-Rezeptor-wt induzierte $G\alpha_{13}$ -p115-FRET Interaktion wurde von Anna-Lena Krett gemessen und stammt aus deren Masterarbeit (Krett, 2015). Aufgrund des rechts verschobenen EC₅₀ wurde die U46619-Konzentration für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von 1-2 nM

für den TP-Rezeptor-wt auf 200 nM für den mutierten Rezeptor angepasst. Die TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K zeigte bei Depolarisation eine signifikant stärkere Aktivierung als der TP-Rezeptor-wt, gemessen in der $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion; *Abbildung 5-10C*. Da R295^{7.40} unter physiologischen Bedingungen, eine geladene Aminosäure ist, könnte sie möglicherweise als Teil eines Spannungssensors für den TP-Rezeptor dienen. Durch Entfernen der Ladung in dieser Position, mittels einer Mutation von Arginin zu Alanin, sollte dann die Spannungsabhängigkeit reduziert oder weggenommen sein. Laut Literatur führte eine Analoge Mutation von R^{7.40} zu Alanin beim IP-Rezeptor zu einer Aufhebung der Ligandenbindung (Stitham *et al.*, 2003). Wir beobachteten eine Agonist-induzierte Rezeptoraktivierung für die TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A im $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay, der EC₅₀ war im Vergleich zum Rezeptor-wt bei der TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A weiter nach rechts verschoben, *Abbildung 5-10B*. Die TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A zeigte eine robuste Aktivierung bei Depolarisation, *Abbildung 5-10D*, was darauf hinweist, dass die positive Ladung in R^{7.40}295 nicht der Spannungssensor ist. Somit zeigten alle von uns getesteten Rezeptor-Mutanten, so wie der Wildtyp eine Aktivierung bei Depolarisation, *Abbildung 5-10E*.

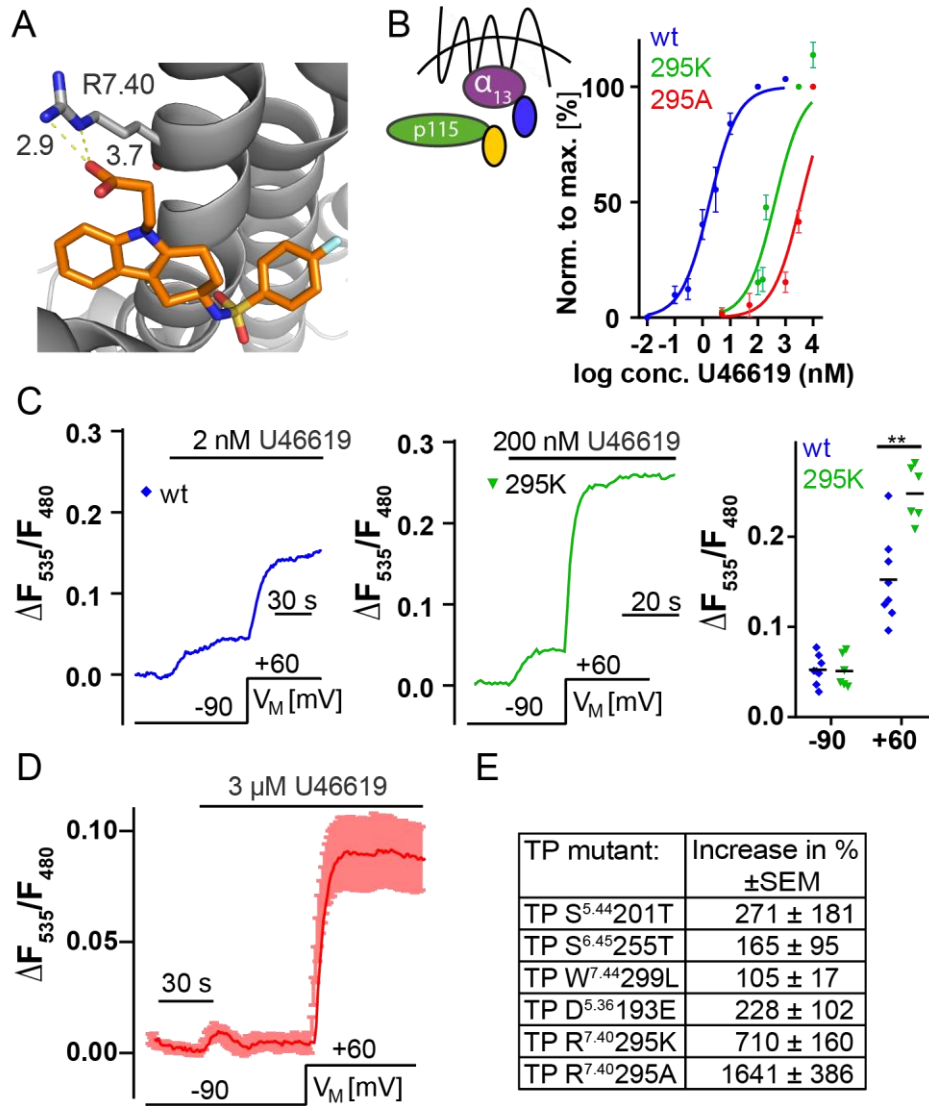


Abbildung 5-10 Verstärkter Spannungseffekt auf TP-Rezeptor R295 Mutanten
 (A) Ausschnitt aus der Kristallstruktur des mit Ramatroban co-kristallisierten TP-Rezeptors (PDB: 6IIU). Die schwarzen Zahlen geben die minimalen Abstände schwerer Atome (in Angström) zwischen der Carboxylgruppe von Ramatroban und TP-Rezeptor R295^{7.40} an. (B)-(D): Dargestellt sind Einzelzell-FRET-Messungen mit HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und entweder TP-Rezeptor oder der jeweils angegebenen TP-Rezeptor-Mutante transfiziert wurden. (B) Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Konzentrations-Wirkungskurven aufgenommen mit TP-Rezeptor-wt ($EC_{50} = 2$ nM, blau) normalisiert auf 0,1 μ M U46619, TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K ($EC_{50} = 415$ nM, grün) normalisiert auf 3 μ M U46619 und TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A ($EC_{50} = 3557$ nM, rot) normalisiert auf 10 μ M U46619. Für die TP-Rezeptor-Mutanten R295^{7.40}K und R295^{7.40}A wurde die Steigung der TP-Rezeptor-wt Kurve (0,85) übernommen (TP-Rezeptor-wt $n = 7-12$; TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K $n = 3-4$; TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A $n = 4$; Zellen pro Datenpunkt). Für die TP-Rezeptor-wt-induzierte Interaktion von $G\alpha_{13}$ und p115 wurde ein zuvor beschriebener mikroskopischer Aufbau verwendet (Bodmann et al., 2017). (C)-(D) FRET Messungen wurden unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung durchgeführt. (C) Links: Mittelwert \pm SEM. Die Zellen wurden in Gegenwart von U46619 von -90 mV auf +60 mV depolarisiert (TP-Rezeptor-wt (blau): $n = 6$, TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K (grün) $n = 5$). Rechts: Die Zellen

wurden für eine bessere Vergleichbarkeit auf eine ähnliche Reaktion bei -90 mV auf U46619 ausgewählt (Eingeschlossen wurden Zellen mit einer Reaktion auf U46619 bei -90 mV: $0,02 \leq \Delta F_{535} / \Delta F_{480} \leq 0,08$). Die Reaktionen der ausgewählten Zellen auf +60 mV wurden zwischen dem Rezeptor-wt und den Rezeptor-Mutanten verglichen (TP-Rezeptor-wt: Mittelwert = $3,13 \pm 0,11$, $n = 7$; TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K: Mittelwert = $5,31 \pm 0,75$, $n = 6$; Mann Whitney Test $**p = 0,0012$). (D) Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von Messungen an TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A ($n = 6$). (E) Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM für die gemessene Aktivierung nach Depolarisation am TP-Rezeptor in Gegenwart von U46619, für die jeweils angegebene TP-Rezeptor-Mutante. Die FRET Antwort auf -90 mV wurde mit der FRET Antwort bei +60 mV verglichen. Es ist zu beachten, dass die relativ starken Unterschiede in der Aktivierung, außer denen für TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K und TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A, möglicherweise auf Unterschiede in der initialen Reaktion auf -90 mV zurückzuführen sind und daher nicht unbedingt die tatsächlichen Unterschiede in der Stärke des Spannungseffekts widerspiegeln (TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K: $n = 11$; TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A: $n = 13$).

Um mehr über die Rolle von R^{7.40}295 in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit herauszufinden, wurde eine Spannungs-Wirkungskurve im Ga₁₃-p115-Interaktions-Assay für TP-Rezeptor-wt (mit Messungen ähnlich wie in *Abbildung 5-11A*) und für R295^{7.40}K und R295^{7.40}A (mit Messungen ähnlich wie in *Abbildung 5-11B*), aktiviert mit U46619, gemessen. Von den erhaltenen Werten wurde die Agonisten-induzierte Reaktion auf -90 mV derselben Zelle subtrahiert. Die gemessenen Membranpotentiale lagen zwischen -110 mV und +100 mV (*Abbildung 5-11C*). Die Kurven für die Mutanten waren im Vergleich zur Kurve des Rezeptor-wts flach und erreichten kein Plateau. Da kein Plateau erreicht wurde, konnte weder ein Boltzmann-Fit durchgeführt noch der $V_{0,5}$ oder ein z-Wert berechnet werden. Bei -45 mV und +60 mV zeigten die Werte für TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K und TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Rezeptor-wt (n : wt = 7; R295^{7.40}K, R295^{7.40}A = 5; Mann-Whitney-Test R295^{7.40}K: $*p = 0,0303$; R295^{7.40}A $**p = 0,0025$); 60 mV (n : wt = 6; R295^{7.40}K, R295^{7.40}A = 7; Mann Whitney R295^{7.40}K: $*p = 0,0350$, R295^{7.40}A $**p = 0,0082$). Bei +100 mV zeigten die Werte für die TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Rezeptor-wt (n : wt = 5; R295^{7.40}K = 6; Mann-Whitney-Test R295^{7.40}K: $**p = 0,0087$), *Abbildung 5-11C*.

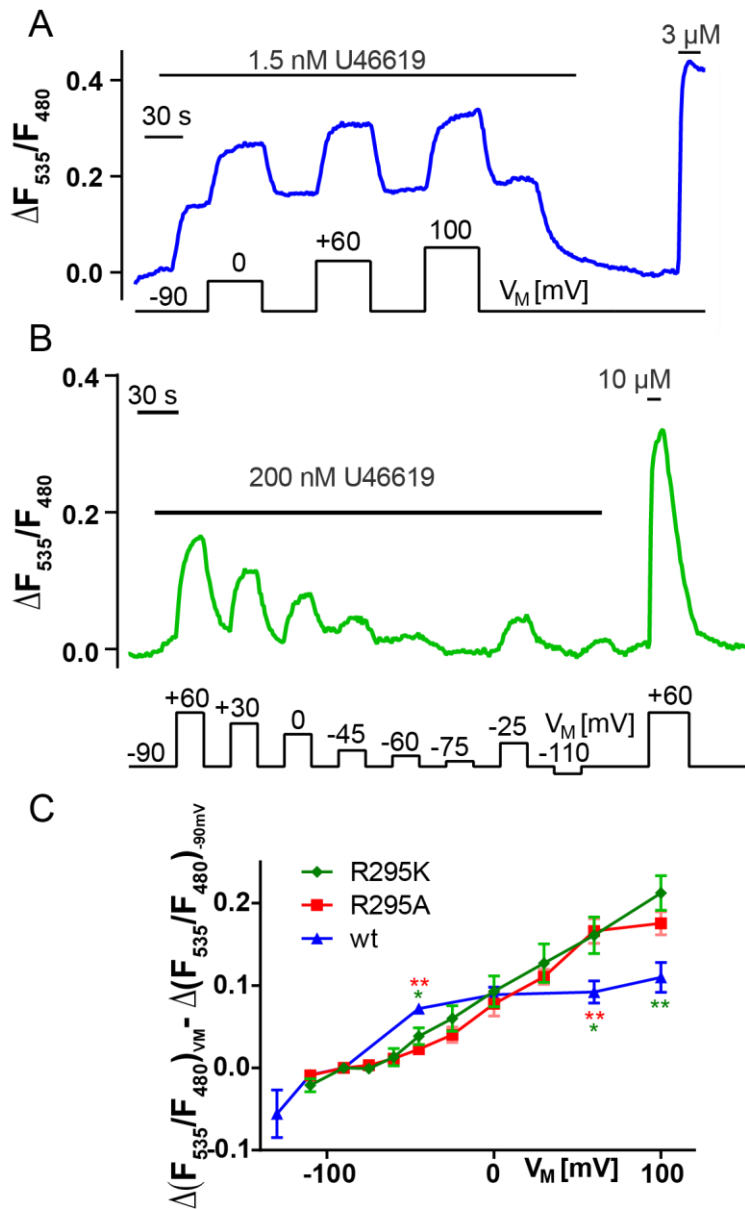


Abbildung 5-11 Veränderung der Spannungs-Wirkungs-Kurve durch Mutation an R295

(A)+(B) Repräsentative Messungen zeigen die Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors bzw. dessen Mutanten für angegebene Spannungen in dem TP-induzierten G_{i13} -p115-FRET-Interaktions-Assay, aktiviert mit der jeweils angegebenen Konzentration von U46619. Als Bezugspotential wurden immer 0 mV und -90 mV eingeschlossen. TP-Rezeptor-wt (blau, $n = 6$); TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K (grün, $n = 6$) (C) Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der spannungsinduzierten Änderungen von $\Delta F_{535}/F_{480} - \Delta F_{535}/F_{480(-90\text{ mV})}$ gemessen an Zellen, die mit dem G_{i13} -p115 - Interaktions-Assay und entweder TP-Rezeptor-wt, TP-Rezeptor-Mutanten R295^{7.40}K oder R295^{7.40}A transfiziert wurden. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgte mit U46619 ($n = 3 - 14$ pro Datenpunkt). Für -45 mV-Werte zeigten TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}K und TP-Rezeptor-Mutante R295^{7.40}A einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Rezeptor-wt (Mittelwerte \pm

SEM, wt $n = 7$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.07 \pm 0.005$; R295^{7.40}K $n = 5$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.02 \pm 0.005$; R295^{7.40}A $n = 5$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.04 \pm 0.01$; Mann Whitney Test R295^{7.40}K vs wt: $*p = 0.03$, R295^{7.40}A vs wt $**p = 0.003$); 60 mV (Mittelwerte \pm SEM, wt $n = 6$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.09 \pm 0.01$; R295^{7.40}K $n = 7$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.17 \pm 0.01$; R295^{7.40}A $n = 7$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.16 \pm 0.02$; Mann Whitney Test R295^{7.40}K vs wt: $*p = 0.04$, R295^{7.40}A vs wt $**p = 0.001$); 100 mV (Mittelwerte \pm SEM, wt $n = 5$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.11 \pm 0.02$; R295^{7.40}K $n = 6$, $\Delta F_{535}/F_{480} = 0.21 \pm 0.02$; Mann Whitney test R295^{7.40}K vs wt: $**p = 0.009$).

5.1.8 Spannungsabhängigkeit des Prostaglandin F Rezeptors

Der TP-Rezeptor gehört zur Gruppe der Prostanoid-Rezeptoren. Endogene Liganden, die andere Rezeptoren dieser Familie aktivieren können, sind ebenfalls COX-Produkte der Arachidonsäure. Wir fragten uns, welches Spannungsverhalten andere Mitglieder dieser Rezeptorfamilie zeigen, wenn sie durch Liganden, die eine Prostanoid-Struktur aufweisen, aktiviert werden. Die Affinität des FP-

Rezeptors zu U46619 ist nur 10-mal niedriger als die des TP-Rezeptors (Abramovitz *et al.*, 2000), wodurch wir U46619 für unsere Spannungsabhängigkeitsmessungen am FP-Rezeptor verwenden konnten. Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des FP-Rezeptors wurde unter gleichzeitiger Kontrolle des V_M mittels *Patch-Clamp* Technik die $G\alpha_q$ -Aktivierung auf Basis des $G\alpha_q$ -FRET-Assays. In diesen Messungen spiegelt eine Abnahme der Emissionsratio eine Rezeptoraktivierung wider. In Anwesenheit von U46619 führte eine Depolarisation zu einer Aktivierung des Rezeptors, *Abbildung 5-12A*. In HEK293T-Zellen ohne transfizierten FP-Rezeptor konnte hingegen keine $G\alpha_q$ -Aktivierung bei U46619 Gabe beobachtet werden, *Abbildung 5-12B*.

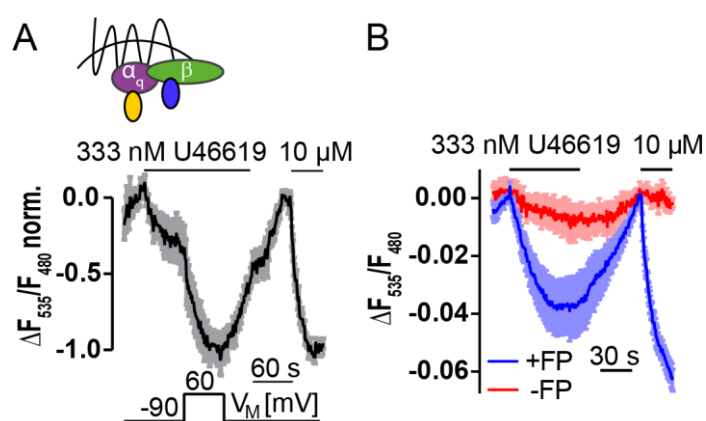


Abbildung 5-12 Spannungsabhängigkeit des Prostaglandin F Rezeptors
(A) Mittelwert \pm SEM von HEK293T-Zellen, die mit FP-Rezeptor und FRET $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 333 nM U46619 aktiviert. Mit Agonisten aktivierte Zellen wurden von -90 auf +60 mV und wieder zurück geklemmt. Die einzelnen Messungen wurden auf die negative Reaktion bei Stimulation mit 10 μ M U46619 normalisiert und gemittelt

($n = 6$). (B) FRET Messung mit $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay transfizierten HEK293T-Zellen: mit (blau) und ohne (rot) zusätzlich transfizierten FP-Rezeptor wurden mit U46619 stimuliert (FP-Rezeptor $n = 7$; pcDNA3 $n = 6$).

5.1.9 Keine Spannungsabhängigkeit für IP-Rezeptor detektierbar

Da es keinen offensichtlichen Unterschied in der Spannungsabhängigkeit zwischen dem TP-Rezeptor und FP-Rezeptor gab, wollten wir einen Rezeptor testen, der eine geringere Affinität für U46619 besitzt und daher wahrscheinlich eine Bindungstasche aufweist, die sich stärker vom TP-Rezeptor als der FP-Rezeptor unterscheidet. Daher haben wir den IP-Rezeptor, das physiologische Gegenstück zum TP-Rezeptor, in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit untersucht. Aufgrund des Fehlens robuster FRET-basierter Assay auf Rezeptor- oder G-Protein-Ebene, haben wir die cAMP-Produktion mit einem FRET-basierten Epac1-cAMP Sensor (Nikolaev *et al.*, 2004), als Maß für die Aktivität des $G\alpha_s$ -gekoppelten IP-Rezeptors, bei -90 oder 0 mV gemessen.

Da der endogene Agonist Prostacyclin (PGI_2) instabil ist, wurde das stabile Analogon Iloprost verwendet, *Abbildung 5-13*.

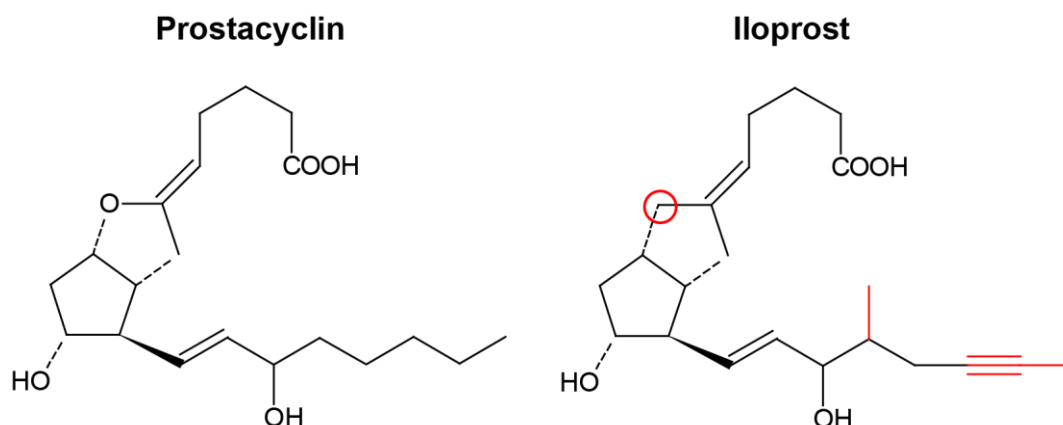


Abbildung 5-13 Vergleich zwischen Prostacyclin und dem stabilen Analogon Iloprost Unterschiede zwischen Prostacyclin und Iloprost wurden in rot hervorgehoben.

Für die Messungen wurde der IP-Rezeptor und Epac1-cAMP Sensor für die Messungen transfiziert. Da das Erreichen eines cAMP Plateaus sehr lange dauerte, was bei gepatchten Zellen eine Herausforderung darstellt, wurden zwei verschiedene Protokolle gemessen. Bei beiden Protokollen wurde eine nicht sättigende Konzentration von Iloprost, einem stabilen Analogon von Prostacyclin, das bekanntermaßen den IP-Rezeptor aktiviert, appliziert.

Eine Gruppe von Zellen wurde für die gesamte Zeit der Messung bei -90 mV gehalten. Die andere Gruppe wurde während der Iloprost Applikation 120 s bei -90 mV gehalten und weitere 120 s auf 0 mV geklemmt, *Abbildung 5-14A* links. Die Epac1-cAMP-FRET-Signaländerung in beiden Gruppen wurde nach 120 s und nach 240 s verglichen. Überraschenderweise konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass in unserem System keine nachweisbare Spannungsabhängigkeit des mit Iloprost aktivierten IP-Rezeptors vorliegt, *Abbildung 5-14A* Mitte. Um sicherzustellen, dass in diesem System die Weitergabe des Spannungseffektes von Rezeptor auf Ebene des Effektors durch $G\alpha_s$ möglich war, wurde als Positivkontrolle der $G\alpha_s$ -gekoppelte β_2 adrenerge Rezeptor (β_2AR) gemessen. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der cAMP Menge bei Depolarisation, was mit einer vorangegangenen Untersuchung an diesem Rezeptor im Einklang steht (Birk *et al.*, 2015). Die Sichtbarkeit der Spannungsabhängigkeit des β_2AR in diesem System zeigt, dass sogar die Spannungsabhängigkeit von GPCRs, die wenig auf die Regulation durch das Membranpotential ansprechen, im verwendeten Assay nachgewiesen werden kann, *Abbildung 5-14B* links. Als zweite Positivkontrolle mit umgekehrter Polarität der Spannungsabhängigkeit wurde der TP-Rezeptor im cAMP Assay gemessen. Auch hier zeigte sich eine deutliche Aktivierung des TP-Rezeptor induzierten Signals bei Depolarisation, wie zuvor unter anderem in *Abbildung 5-4* und *Abbildung 5-5* beobachtet. HEK293T-Zellen ohne zusätzlich transfizierten IP-Rezeptor zeigten bei Stimulation mit Iloprost keine cAMP-Produktion, *Abbildung 5-14C*.

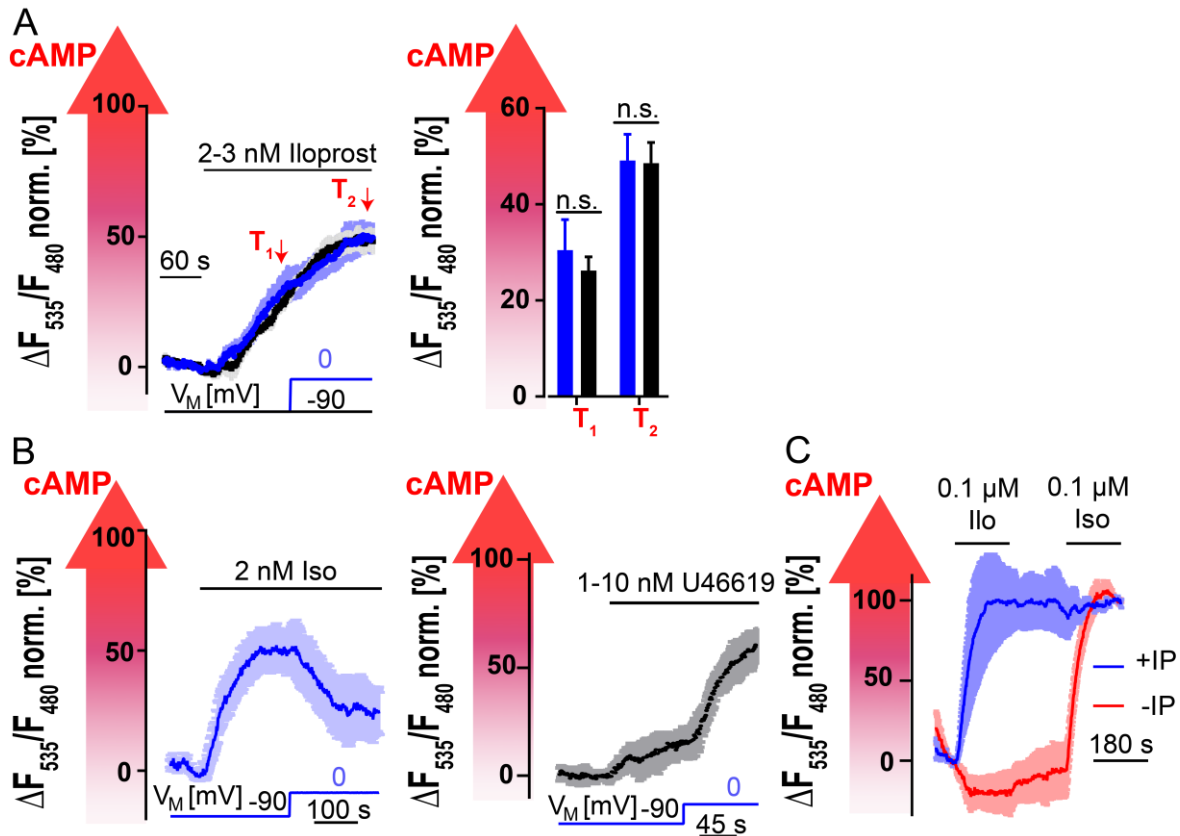


Abbildung 5-14 Keine detektierbare Spannungsabhängigkeit für den IP-Rezeptor

(A) Links: Mittelwert \pm SEM von Messungen mit HEK293T-Zellen, die mit mcherry-IP-Rezeptor und Epac1-cAMP Sensor transfiziert wurden. Die einzelnen Messungen wurden auf die Reaktion bei Stimulation mit 0,1 μ M Iloprost (Ilo) normalisiert und gemittelt (0 mV: $n = 5$; -90 mV $n = 4$). Eine nicht sättigende Konzentration von Iloprost wurde auf Zellen appliziert, die bei -90 mV gehalten wurden, und nach 120 s wurde die mittlere cAMP-Produktion gemessen (T_1). Anschließend wurden die Zellen entweder auf 0 mV (blau) geklemmt oder 120 s bei -90 mV gehalten (schwarz). Die mittlere cAMP-Produktion wurde für beide Gruppen gemessen (T_2). Rechts: T_1 blau: $30,5\% \pm 6,3\%$ schwarz: $26,2\% \pm 2,9\%$; T_2 blau $49,1\% \pm 5,4\%$; schwarz $48,6\% \pm 4,3\%$. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bedingungen bei der Produktion von cAMP beobachtet. (B) Links: Messung der Spannungsabhängigkeit des β_2 AR im cAMP-Assay. Die Zellen wurden mit Isoprenalin (Iso) stimuliert und auf die angegebenen Potentiale geklemmt, die Messungen wurden auf die Reaktion die durch 0,1 μ M Isoprenalin hervorgerufen wurde normalisiert ($n = 5$). Rechts: Messung der Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors im cAMP-Assay. Die Zellen wurden, in Anwesenheit von 1 μ M des selektiven G_{α_q} -Inhibitors FR900359, mit U46619 stimuliert und auf die angegebenen Potentiale geklemmt, die Messungen wurden auf die Reaktion, die durch 3 μ M U46619 hervorgerufen wurde, normalisiert ($n = 5$) (C) FRET Messung mit HEK293T-Zellen, die mit Epac1-cAMP Sensor transfiziert wurden: mit (blau) und ohne (rot) zusätzlich transfizierten mcherry-IP-Rezeptor wurden mit Iloprost und anschließend mit Isoprenalin stimuliert (mit IP-Rezeptor $n = 4$; ohne IP-Rezeptor $n = 5$).

5.1.10 Spannungsabhängigkeit des EP₃-Rezeptors

Als Nächstes wurde der G α_i -gekoppelte EP₃-Rezeptor untersucht. Als Maß für die Rezeptoraktivität des EP₃-Rezeptors wurden durch diesen induzierte GIRK-Ströme gemessen, da es sich hierbei um den zur Verfügung stehenden Assay mit dem besten Signal zu Rausch Verhältnis handelt. Das G-Protein G α_i kann durch seine $\beta\gamma$ -Untereinheit GIRK Kanäle direkt aktivieren. Bei dem GIRK Kanal (G-Protein-gekoppelte einwärtsgerichteter Kalium-Kanal) handelt es sich um einen spezifischen einwärts gerichteten K⁺-Kanal. Die Messung von GIRK Strömen ist ein klassisches Echtzeitreadout für G $\alpha_{i/o}$ -Aktivität, dass mittlerweile auch für Untersuchungen der Spannungsabhängigkeit von GPCRs etabliert wurde (Ben-Chaim *et al.*, 2003, 2006). Als Agonist wurde auch hier Iloprost verwendet, von dem bekannt war, dass es ebenfalls am EP₃-Rezeptor bindet (Abramovitz *et al.*, 2000). Für die Messungen wurden HEK293T-Zellen transient mit dem EP₃-Rezeptor und GIRK1/4 transfiziert. Der durch Reaktion auf eine submaximale Konzentration von 10 nM Iloprost bei -90 und -30 mV hervorgerufene Strom wurde jeweils mit dem maximalen Strom verglichen, der durch Gabe von 1 μ M Iloprost bei der entsprechenden Membranspannung hervorgerufen wurde, *Abbildung 5-15A*. Einwärtsgerichtete K⁺-Kanäle lassen sich durch Ba²⁺-Ionen hochaffin und hochselektiv blocken (Lancaster *et al.*, 2000). Da sich die gemessenen Ströme durch Gabe von Ba²⁺ blocken ließen, *Abbildung 5-15A*, und die I/V-Kurve eine Gleichrichtung nach innen zeigte, *Abbildung 5-15B*, kann es als bestätigt angesehen werden, dass die gemessenen Ströme tatsächlich GIRK-Ströme waren. Das Verhältnis des durch 10 nM Iloprost hervorgerufenen Stroms war im Vergleich zu den von 1 μ M Iloprost aktivierten Stroms bei -30 mV viel größer als bei -90 mV, was auf eine Aktivierung des EP₃-Rezeptors nach Depolarisation in Gegenwart von Iloprost hindeutet, *Abbildung 5-15A*.

Neben dem EP₃-Rezeptor haben wir auch versucht den EP₁-Rezeptor auf Spannungsabhängigkeit zu testen, sind jedoch gescheitert, da keiner unserer Assay mit diesem Rezeptor ein Agonist-induzierbares Signal zeigte (Daten nicht gezeigt).

Anschließend führten wir mit GPCRdb.org ein strukturbasiertes Alignment zwischen den vier Prostanoid-Rezeptoren durch, die in dieser Studie hinsichtlich Spannungsabhängigkeit charakterisiert wurden. Wir suchten insbesondere nach Unterschieden in den geladenen Resten. Die spannungsaktivierten Prostanoid-Rezeptoren TP-Rezeptor, FP-Rezeptor und EP₃-Rezeptor wiesen in Position 3.19 ein negativ geladenes Aspartat auf. Der nicht spannungsaktivierte IP-Rezeptor hingegen wies an dieser Stelle ein positiv geladenes Arginin auf. Wir fragten uns, ob eine Mutation in dieser Position zu einer Veränderung Spannungsabhängigkeit führen könnte. Wir mutierten den EP₃-Rezeptor in Position 3.19 von Aspartat zu Arginin, *Abbildung 5-15C*. Die Agonist-aktivierte EP₃-Rezeptor-Mutante D^{3.19}124R aktivierte bei Depolarisation, *Abbildung 5-15D*, was darauf hinwies, dass den beobachteten Unterschieden in der Spannungsabhängigkeit ein komplexerer Mechanismus zugrunde lag.

Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren

Es ist zu beachten, dass GPCRdb.org in der Zwischenzeit die Positionen für die Aminosäuren des TP-Rezeptors neu berechnet hat und TP-Rezeptor D99 von Position 3.19 in ECL1 verschoben wurde.

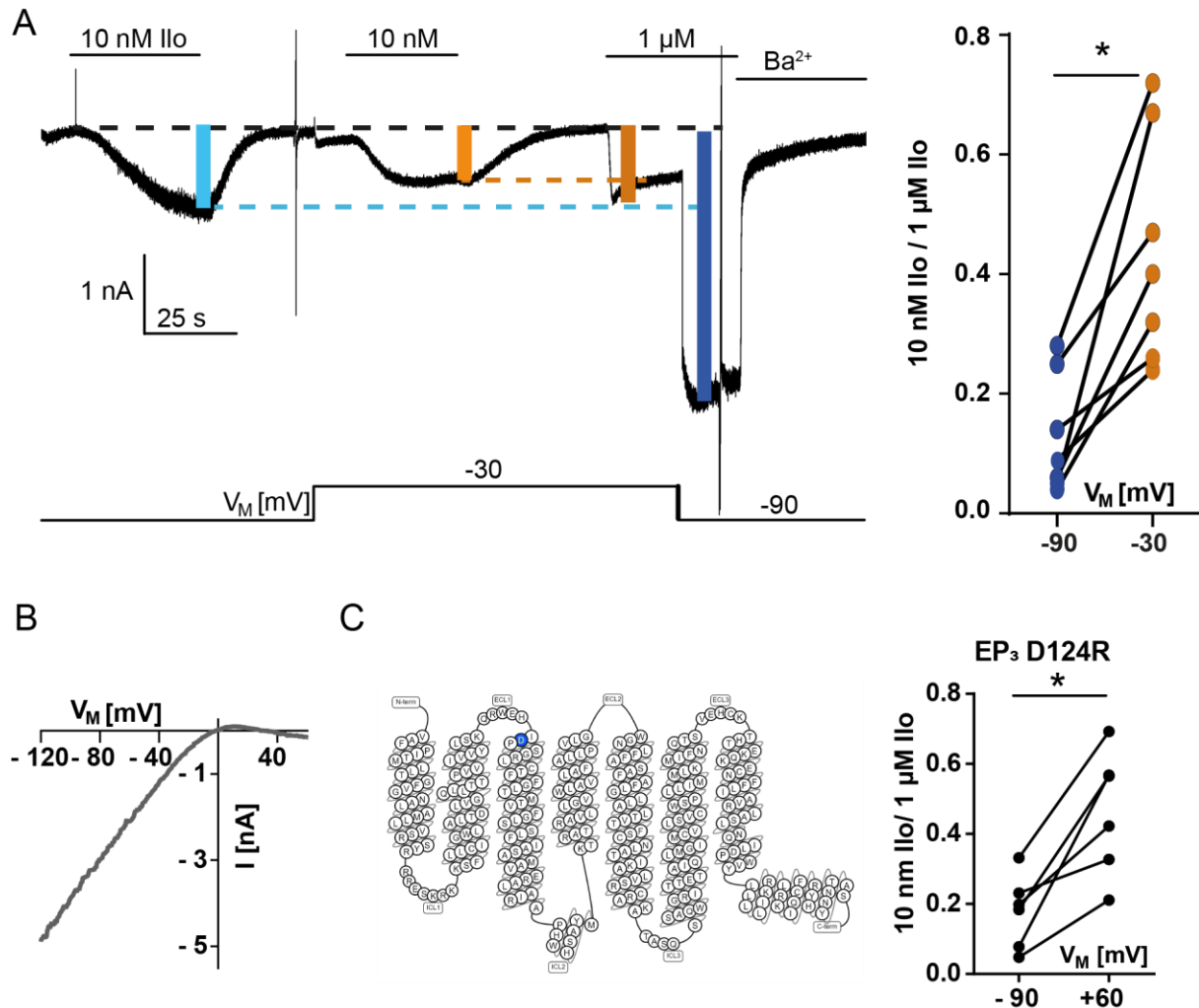


Abbildung 5-15 Spannungsabhängigkeit des EP₃-Rezeptors Links: Repräsentativer einwärts K⁺-Strom gemessen an einer HEK293T-Zelle, die EP₃-Rezeptor-wt und GIRK-Kanäle exprimierte, hervorgerufen durch 10 nM bzw. 1 μM Iloprost, gemessen bei -90 mV oder -30 mV (n = 6). Rechts: Das gemessene Verhältnis der GIRK-Ströme (10 nM / 1 μM) zeigt an, dass die Reaktion auf 10 nM Iloprost bei -30 mV gegenüber dem Verhältnis bei -90 mV potenziert war (Mittelwerte ± SEM; Verhältnis der GIRK-Ströme (10 nM / 1 μM) bei -90 mV = 0,13 ± 0,04; bei -30 mV = 0,44 ± 0,07; *p = 0,0156, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). (B) Hintergrund-subtrahierte I/V-Kurve für die in (A) gezeigte Zelle. Die Kurve wurde durch eine Spannungsrampe während Iloprost-Stimulation erhalten. Von dieser wurde die Spannungsrampe während der Anwesenheit von Barium subtrahiert. Die erhaltene Kurve zeigte eine starke Gleichrichtung nach innen. (C) Links: Snakeplot des EP₃-Rezeptors, erstellt mit GPCRdb.org, in der die Positionen von D124^{3.19}R blau hervorgehoben wurde. Rechts: Mit HEK293T-Zellen, die EP₃-Rezeptor-Mutante D^{3.19}124R und GIRK-Kanäle exprimierten wurden Messungen analog zu denen in (A) gezeigten durchgeführt. Das gemessene Verhältnis der GIRK-Ströme (10 nM / 1 μM) zeigt an, dass die Reaktion auf 10 nM Iloprost bei -30 mV gegenüber dem Verhältnis bei -90 mV potenziert war

(Mittelwerte \pm SEM; Verhältnis der GIRK-Ströme ($10 \text{ nM} / 1 \text{ }\mu\text{M}$) bei $-90 \text{ mV} = 0,18 \pm 0,04$; bei $-30 \text{ mV} = 0,46 \pm 0,07$; $n = 6$; $*p = 0,0313$. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

5.1.11 Keine Spannungsabhängigkeit für PAR1 detektierbar

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch der PAR1 mithilfe des besonders sensitiven $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assays auf Spannungsabhängigkeit untersucht. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um vorläufige Messergebnisse, die durch weitere Untersuchung in der Zukunft vervollständigt werden müssen. Es gab bereits in der Vergangenheit Hinweise auf eine mögliche Spannungsabhängigkeit des PAR1. So konnte gezeigt werden, dass die Membrandepolarisation einen Thrombin-induzierten Calciumeinstrom und die Aggregation in menschlichen Thrombozyten hemmt (Kovács *et al.*, 1990). Beim PAR1 handelt es sich um einen peptidischen Klasse A GPCR, der physiologisch durch Kürzung des N-Terminus von der Protease Thrombin aktiviert wird. Der gekürzte N-Terminus fungiert hierbei als aktivierender Ligand mit der Erkennungssequenz: TFLLR (Aminosäuresequenz). PAR1 koppelt primär mit $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{13}$ (McCoy *et al.*, 2010). Für weitere Untersuchungen, wurden HEK293T-Zellen mit der PAR1-Rezeptor-induzierte $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion transfiziert und in FRET-Einzelzellmessungen untersucht. Da der Rezeptor durch Thrombin (FIIa) irreversibel aktiviert, wurde zunächst für 30 s Faktor IIa gegeben, um zu sehen, ob ein stabiles Signal erreicht wird, mit dem wiederum der Effekt von V_M auf die Rezeptor-Aktivität untersucht werden konnte. Es zeigte sich, dass 30 s FIIa Applikation zu einer transienten $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktion führte, *Abbildung 5-16A*. Bei wiederholter Applikation in derselben Zelle wurde die induzierte Interaktion kleiner, bis sie bei der dritten Applikation völlig verschwand, *Abbildung 5-16A*. Da der Rezeptor durch FIIa irreversibel aktiviert wird und die TP Rezeptor induzierte $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktion stabil war, ist für das beobachtete transiente Signal möglicherweise eine Desensitisierung durch das GRK-Arrestin System verantwortlich. Für die PAR1 induzierte $G\alpha_{13}$ -Aktivierung durch FIIa Applikation wurde in der Vergangenheit ebenfalls schnelle transiente Signale beobachtet (Mastop *et al.*, 2018). Im nächsten Schritt wurde FIIa für 300 Sekunden appliziert. Bei dieser Form der Applikation zeigte sich initial eine robuste Interaktion zwischen $G\alpha_{13}$ -p115 und im Anschluss eine langsamere Abnahme des Signals, als zuvor für das Protokoll der kurzen Pulse beobachtet, *Abbildung 5-16B*. Dieses Protokoll wurde für die Untersuchung auf Spannungsabhängigkeit übernommen und die Spannungsänderung während des Signlrückgangs durchgeführt. Hierbei zeigte sich keine offensichtliche Änderung des PAR1 Rezeptoraktivitätsverlaufs gegenüber den Messungen ohne Spannungsänderung, *Abbildung 5-16C*. Für weitergehende Untersuchungen haben wir den PAR1 Rezeptor C-Terminal mittels Schnittstellen mit YFP markiert. Das resultierende Konstrukt wies keine für FRET Messungen geeignete Membranlokalisation auf, *Abbildung 5-16D*. Das Einbringen einer zuvor beschriebenen Linkersequenz, YRDPVPVAT (Ayoub

et al., 2007), führte zu einer guten Membranlokalisation, *Abbildung 5-16E*, so dass weitergehende Untersuchungen in der Zukunft mit diesem Konstrukt möglich sind.

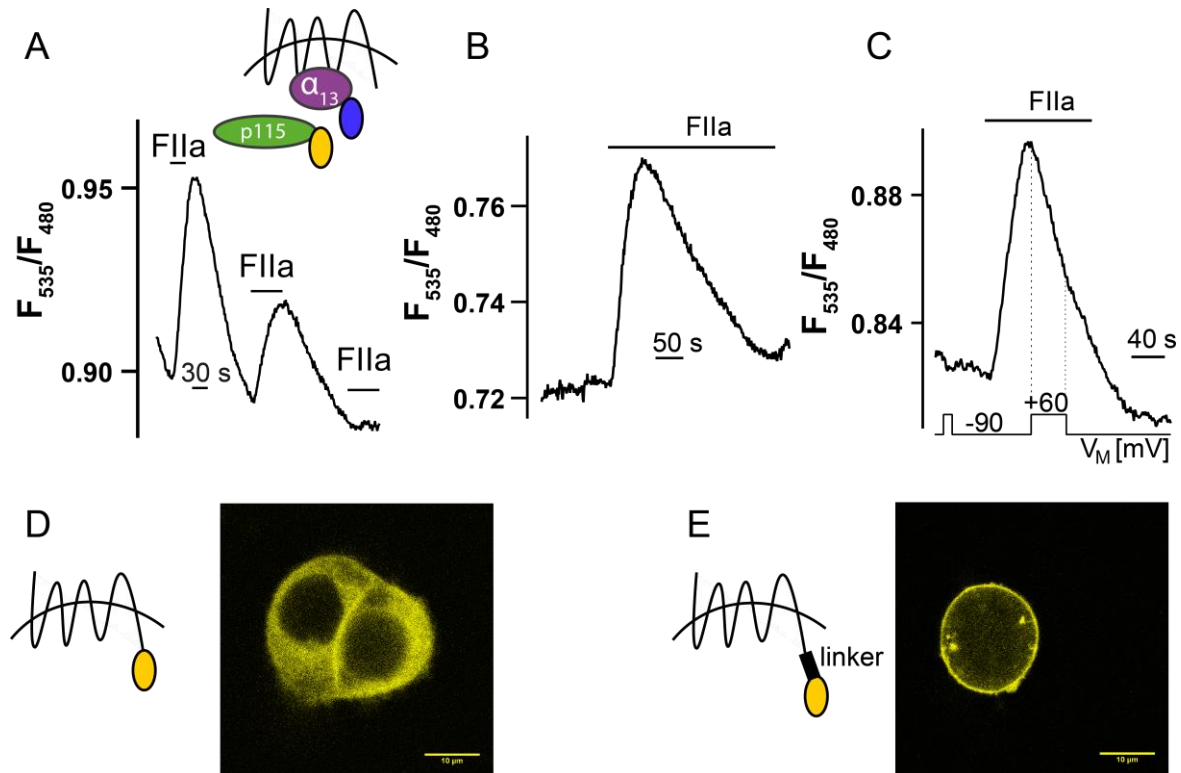


Abbildung 5-16 Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des PAR1 (A) – (C) Mit einem FRET-basierten Biosensor für PAR1-Rezeptor-induzierte $G_{\alpha_{13}}$ -p115-RhoGEF-Interaktion transfizierte Zellen wurden FRET-Einzelzellmessungen entsprechend dem angezeigten Applikationsprotokoll mit vorgewärmtem ECS durchgeführt. Die applizierte Konzentration Thrombin (FIIa) betrug jeweils 1 U/ml. (A) und (B) stellen repräsentative Messungen von jeweils $n = 3$ dar. (C) FRET-Messung unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung. Es handelt sich um eine repräsentative Messung von $n = 3$. (D) und (E) Konfokal mikroskopische Bilder von HEK293T-Zellen, die transient mit (D) PAR1-YFP und (E) PAR1-Linker-YFP transfiziert wurden.

5.2 Diskussion

5.2.1 Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Gruppe der transmembranären Rezeptoren und zählen zu den wichtigsten Zielstrukturen für aktuell zugelassene Arzneimittel, sowie zu den vielversprechenden potentiellen Zielstrukturen für die Erforschung zukünftiger Arzneimittel. Daher ist die beobachtete Spannungsabhängigkeit der Liganden-aktivierten GPCR-Aktivität sehr interessant und gleichzeitig aufgrund fehlender konservierter Ladungen und den großen Unterschieden gegenüber Ionenkanälen erstaunlich. Bei spannungsgesteuerten Ionenkanälen befindet sich im vierten transmembranären Segment (S4) eine Gruppe positiv geladener Aminosäuren. Eine durch Spannungsänderung induzierte Bewegung dieses Segments führt zu einer Konformationsänderung, die in der Folge zu einer veränderten Leitfähigkeit des Kanals für bestimmte Ionen führt (Bezaniilla, 2008). Eine dem S4-Segment ähnliche Struktur ist bei GPCRs nicht zu finden. Trotzdem konnte für diese ebenfalls eine Ladungsverschiebung innerhalb des Rezeptors am Beispiel der M1AChR und M2AChR direkt gemessen und für andere Rezeptoren indirekt bestimmt werden. Die Werte der Ladungsverschiebung waren aber etwa um Faktor 10 kleiner als die für Ionenkanäle gemessenen (Ben-Chaim *et al.*, 2006; Owen N Vickery *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu den spannungsabhängigen Ionenkanälen lassen sich GPCRs nicht allein durch Spannungsänderung aktivieren und deaktivieren, sondern lediglich deren Aktivität modulieren und dies nach bisherigem Stand auch nur in Anwesenheit von Agonisten. In einer vor kurzem erschienenen Studie wurde allerdings erstmals zusätzlich ein Einfluss der Membranspannung auf die G-Protein-Kopplung eines basal aktiven M2AChR in Abwesenheit von Liganden beschrieben (Yair *et al.*, 2019).

Vor allem aufgrund dieser fehlenden offensichtlichen Spannungssensoren ist auch heute – über 15 Jahre nach Entdeckung der GPCR- Spannungsabhängigkeit – in weiten Teilen unklar, welcher Mechanismus zugrunde liegt. Weiterhin sind nach wie vor zahlreiche GPCR-Gruppen noch nicht oder nur rudimentär unter diesem Aspekt untersucht.

In dieser Arbeit haben wir die Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren untersucht. Deren Liganden sind verhältnismäßig groß und lipophil und unterscheiden sich somit von denen der aminergen und muskarinischen Rezeptoren, die in diesem Zusammenhang bereits intensiv untersucht wurden (Owen N Vickery *et al.*, 2016). Als Ausgangspunkt für diese Studie haben wir Ergebnisse einer Untersuchung von TP-Rezeptor induzierten spannungsabhängigen Änderungen von Calciumspiegeln an Megakaryozyten genommen (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Diese Untersuchung suggerierte eine Erhöhung der Aktivität des Liganden-aktivierten TP-Rezeptors durch Depolarisation in einer nativen Zelle. Aufgrund der nicht-Linearität von Calciumspiegeländerungen konnten darüber hinaus keine Erkenntnisse über die Qualität und Quantität des Spannungseffektes gezogen werden. In dieser

vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Auswirkung von Spannungsänderungen auf den TP-Rezeptor mittels FRET auf direktere Weise. Darüber hinaus wurden weitere Prostanoid-Rezeptoren unter diesem Aspekt erforscht. Hierfür wurden FRET Messungen einzelner transfizierter Zellen mit verschiedenen FRET-Assay unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung mithilfe der *Patch-Clamp* Technik durchgeführt. Dies sind die wichtigsten Erkenntnisse:

a) Der TP-Rezeptor zeigte eine robuste Spannungsabhängigkeit der Agonist-vermittelten Aktivierung im physiologischen Bereich von V_M und der Spannungseffekt breitete sich auf die nachgeschaltete Signalübertragung aus.

b) Der beobachtete Spannungseffekt konnte auf eine Affinitätsänderung für Prostanoid zurückgeführt werden, der keine Abhängigkeit von Änderungen der Agoniststruktur aufwies und dem wahrscheinlich ein allgemeiner Einfluss der Spannung auf die Rezeptor-Konformation zugrunde lag. R295^{7,40} war an diesem Prozess beteiligt.

c) FP-Rezeptor und EP₃-Rezeptor zeigten bei der Depolarisation eine ähnliche Aktivierung wie der TP-Rezeptor. Überraschenderweise zeigte der IP-Rezeptor keine nachweisbare Spannungsabhängigkeit.

Der TP-Rezeptor zeigte eine robuste Spannungsabhängigkeit im physiologischen Bereich von V_M und der Spannungseffekt breitete sich auf die nachgeschaltete Signalübertragung aus.

Für den von uns eingehend untersuchten TP-Rezeptor kam es ca. zu einer Verdopplung der Agonist-induzierten Rezeptoraktivität bei nicht sättigenden Konzentrationen von U46619 am TP-Rezeptor-Sensor-Assay, *Abbildung 5-4C*, dem TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktions-Assay, *Abbildung 5-5A* und dem TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay und dem der TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_q$ – Aktivierungs-Assay, wenn das Membranpotential von -90 auf +60 mV depolarisiert wurde, *Abbildung 5-5D*. Betrachtet man nur die TP-Rezeptor induzierte $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion und beschränkt sich bei der Analyse auf Zellen, die bei Gabe von U46619 bei -90 mV ein kleines aber nachweisbares Signal zeigten, so führte eine Depolarisation auf +60 mV sogar zu einer Verdreifachung des anfänglichen Signals, *Abbildung 5-10C*. Der EC_{50} für U46619 bei -90 mV im Vergleich zu +60 mV am TP-Rezeptor-Sensor-Assay ungefähr 4,5-fach nach links verschoben, *Abbildung 5-6A*.

Die Ergebnisse für den TP-Rezeptor stimmen mit früheren Ergebnissen überein, die eine Aktivierung nach Depolarisation nahe legten (Martinez-Pinna *et al.*, 2005). Auch für ein anderes Mitglied der Lipidrezeptorgruppe, die Lysophosphatidylsäure-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurden eine Erhöhung der Liganden-aktivierten Rezeptor-Aktivität durch Depolarisation beobachtet (Martinez-Pinna *et al.*, 2010).

Die Größenordnung bisher beobachteter Spannungseffekte an Liganden-aktivierten GPCRs reichen von einer Deaktivierung bei Depolarisation, mit einem um Faktor 2-6 nach rechts verschobenen EC_{50} (Navarro-Polanco *et al.*, 2011; Rinne *et al.*, 2013, 2015) über gar keinen Spannungseffekt (Sahlholm,

Marcellino, *et al.*, 2008a; Moreno-Galindo *et al.*, 2016) bis hin zu einer Aktivierung durch Depolarisation mit einem um Faktor 2-5 nach links verschobenen EC_{50} (Sahlholm, Marcellino, *et al.*, 2008a; Navarro-Polanco *et al.*, 2011; Sahlholm *et al.*, 2011, 2012; Birk *et al.*, 2015; Rinne *et al.*, 2015). Zu den angewandten Assays, mit denen diese Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei unterschiedlichen V_M gemessen wurden, zählen elektrophysiologische Messungen GPCR induzierter GIRK-Ströme, GPCR induzierter G-Protein-Aktivierung, sowie Messungen an GPCR-Rezeptor-Sensoren.

Die Messungen an Rezeptor-Sensoren entsprechen dem von uns verwendeten Assay und sind daher besonders für einen Vergleich geeignet. Meines Wissens nach gibt es nur zwei veröffentlichte K-Ws für unterschiedliche Spannungen an FRET-Rezeptor-Sensoren. Diese wurden gemessen an: M1ACh-Sensor-Assay (M1ACh CAM) und α_{2A} -Sensor-Assay (α_{2A} AR CAM). Für den M1ACh CAM, aktiviert durch Carbachol, wurde bei Depolarisation von -90 mV auf +60 mV eine etwa um Faktor drei nach links verschobener EC_{50} beobachtet (Rinne *et al.*, 2015). Für den α_{2A} AR CAM, aktiviert durch Noradrenalin, führte eine Depolarisation von -90 mV auf +60 mV zu einem etwa um Faktor 6 nach rechts verschobenen EC_{50} (Rinne *et al.*, 2013). Bei einer direkten Untersuchung der Affinitätsänderung mit einem Depolarisationsschritt von -60 bis +40 mV konnte für den M1AChR aktiviert mit ACh ein etwa um Faktor drei nach links verschobener K_D und für den M2AChR aktiviert mit ACh ein etwa um Faktor vier nach rechts verschobener K_D beobachtet werden (Ben-Chaim *et al.*, 2003). Bezogen auf diese gut vergleichbaren Untersuchungen liegt der von uns beobachtete Effekt auf die Rezeptoraktivität durch Änderungen von V_M in einer ähnlichen Größenordnung.

Wie zuvor erwähnt, konnten wir zeigen, dass der Spannungseffekt vom TP-Rezeptor auch auf die nachfolgende Signalübertragung weitergegeben wurde und in etwa die gleiche Größenordnung hatte, *Abbildung 5-5D*. Deshalb ist es von Interesse auch die Stärke des Spannungseffektes die in Messungen stromabwärts von GPCRs aus der Literatur mit in den Vergleich der Stärke des Spannungseffektes einzubeziehen. Für den M3ACh wurde mit Carbachol am $G\alpha_q$ -Aktivierungs-Assay eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve jeweils bei -90 mV und bei +60 mV gemessen. Es konnte ein um etwa Faktor 2 nach rechts verschobener EC_{50} beobachtet werden (Rinne *et al.*, 2015). Für den Dopamin-D2-Rezeptor wurde mit Dopamin am $G\alpha_i$ -Aktivierungs-Assay eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve jeweils bei -80 mV und bei +40 mV gemessen, der EC_{50} war ca. um Faktor 4 nach rechts verschoben (Sahlholm *et al.*, 2011). Der mit Abstand am häufigsten genutzte Assay für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs und zur Messung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei verschiedenen V_M sind elektrophysiologische Messungen von GPCR induzierten GIRK-Strömen. Hierzu zählen Untersuchungen mit zahlreichen unterschiedlichen Liganden am Dopamin-D2-Rezeptor (Sahlholm *et al.*, 2011) mit einer Deaktivierung um Faktor 0,8-6 bei -80 mV gemessen gegen +40 mV, für H3 und H4 Rezeptoren ca. Deaktivierung um Faktor 2, ebenfalls bei -80 mV gemessen gegen +40 mV (Sahlholm *et al.*, 2012), M2ACh aktiviert mit ACh: Faktor 4 nach rechts verschoben bei

Depolarisation von -100 mV auf +50 mV und M2ACh aktiviert mit Pilocarpin beim gleichen Spannungsschritt um Faktor drei nach links verschoben (Navarro-Polanco *et al.*, 2011).

Verglichen mit der Gesamtschau der gemessenen Spannungseffekte auf GPCRs in der Literatur zeigt der TP-Rezeptor eine robuste Spannungsabhängigkeit, die im oberen Bereich der beobachteten Spannungseffekte auf die Rezeptor-Aktivität einzuordnen ist.

Mit einem $V_{0,5}$ von ca. -45 mV lag der Spannungseffekt auf die Liganden-aktivierte Rezeptor-Aktivität mitten im Bereich physiologischer Membranspannungen, *Abbildung 5-4C*.

Der beobachtete Spannungseffekt konnte auf eine Affinitätsänderung für Prostanoid zurückgeführt werden, der keine Abhängigkeit von Änderungen der Agoniststruktur aufwies und dem wahrscheinlich ein allgemeiner Einfluss der Spannung auf die Rezeptor-Konformation zugrunde lag. R295^{7,40} war an diesem Prozess beteiligt.

Dem Spannungseffekt auf die Liganden-aktivierte Rezeptoraktivität an GPCRs kann eine Änderung der Affinität oder der intrinsischen Aktivität zugrunde liegen. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass (1) der EC_{50} für U46619 bei -90 mV im Vergleich zu +60 mV ungefähr 4,5-fach nach links verschoben war und das gleiche Maximum aufwies, *Abbildung 5-6A*, (2) bei einer sättigenden Konzentration von U46619 der Spannungseffekt sogar auf der Ebene des Rezeptorsensors verschwunden war, *Abbildung 5-6B*, (3) die Kinetik der spannungsinduzierten Rezeptor-Aktivierung abhängig von der Konzentration von U46619 war, *Abbildung 5-6C*. Die genannten Beobachtungen sprechen stark für eine dem Spannungseffekt zugrundeliegende Affinitätsänderung des TP-Rezeptors für U46619. Folglich würde man erwarten, dass die Geschwindigkeit der Deaktivierung des TP-Rezeptors durch Hyperpolarisation der Membran die annähernd gleiche Geschwindigkeit wie die Deaktivierung des TP-Rezeptors durch Auswaschen aufweist, da beiden Prozessen die Diffusionsgeschwindigkeit des Liganden zugrunde läge und das von uns verwendete Druckluft betriebene Perfusionssystem ALA VC3-8SP laut Herstellerangaben in der Lage ist innerhalb von nur wenigen Millisekunden die Kanäle zu wechseln und somit die Lösung, die die untersuchte Zelle umgibt, auszutauschen, was ein Vergleichen der Deaktivierungs-Geschwindigkeit am TP-Rezeptor hervorgerufen durch Spannungsänderung mit der Deaktivierungs-Geschwindigkeit, ausgelöst durch Ausspülen in unserem experimentellen Aufbau ermöglicht. Überraschenderweise konnten wir für die Geschwindigkeit der Deaktivierung des TP-Rezeptors einen deutlichen Unterschied feststellen, abhängig davon, ob der Rezeptor durch Hyperpolarisation oder durch Auswaschen mit extrazellulärem Puffer, ausgehend von der gleichen initialen Konzentration des Agonisten, deaktiviert wurde, *Abbildung 5-6F*. Eine Erklärung für diesen auf den ersten Blick widersprüchlichen Befund könnte das langsame Auswaschen des Agonisten aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft und der damit einhergehenden Anreicherung in der Plasmamembran sein. Trotz dieser beobachteten Abweichung von der Vorhersage, und dem sich hieraus ergebenden Argument für eine Änderung der intrinsischen Aktivität durch

Änderung von V_M , wiegen die Argumente, die für eine Affinitätsänderung sprechen, mit einem bei Depolarisation um Faktor 4,5 nach links verschobenen EC_{50} , dem Ausbleiben eines Spannungseffektes bei Depolarisation in Anwesenheit einer sättigenden Agonistkonzentration am TP-Rezeptor-Sensor und der Abhängigkeit der Geschwindigkeit der TP-Rezeptor Aktivierung von der Konzentration von U46619 schwerer, so dass wir schließen, dass die elektrische Membranspannung maßgeblich die Affinität des TP-Rezeptors zu U46619 moduliert.

Obwohl die erstmalige Beschreibung der Spannungsabhängigkeit eines GPCRs bereits über 15 Jahre zurückliegt, konnte bis heute kein molekulares Korrelat für einen allgemeinen Spannungssensor von GPCRs, wie es z.B.: für Ionenkanäle beschrieben wurde, gefunden werden. Als Teil eines möglichen Spannungssensors wurde in einer Publikation der Tyrosindeckel über der Agonisten-Bindetasche an M2AChR beschrieben (Barchad-Avitzur *et al.*, 2016). Die Spannungsempfindlichkeit des Rezeptors wurde den Dipolmomenten des Tyrosins zugeschrieben. Mutanten, die diese Dipolmomente eliminierten bzw. reduzierten, waren in der Lage die Spannungsabhängigkeit für den M2AChR aktiviert mit ACh zu eliminieren bzw. zu reduzieren. Die Spannungsabhängigkeit für den M2AChR aktiviert mit Pilocarpin war nicht betroffen, weshalb der identifizierte Spannungssensor nicht der einzige Spannungssensor für M2AChR sein kann (Barchad-Avitzur *et al.*, 2016). Für den nah verwandten M3AChR führte eine Wegnahme der Dipolmomente durch Mutation zu Phenylalanin an allen drei Tyrosinen zu keinem Verschwinden der Spannungsabhängigkeit für den M3AChR, aktiviert mit ACh, was ebenfalls darauf hindeutet, dass weitere Spannungssensoren vorhanden sein müssen (Hoppe *et al.*, 2018). Ein solcher Tyrosindeckel ist bei den Prostanoid-Rezeptoren nicht vorzufinden, die wie andere lipidische Rezeptoren zu extrazellulären Seite geschlossen sind (Audet and Stevens, 2019), weshalb diese Erklärung hier auch in Teilen nicht tragen kann. Um zumindest einige Einblicke in den molekularen Mechanismus der Spannungsabhängigkeit am TP-Rezeptor zu bekommen, haben wir den Spannungseffekt auf den TP-Rezeptor - aktiviert mit verschiedenen substituierten Prostanoid-Derivaten, die jeweils Modifikationen an verschiedenen Stellen des Moleküls trugen – getestet (zusammengefasst in *Abbildung 5-7I*). Alle getesteten Liganden zeigten eine Aktivierung bei Depolarisation, was auf eine eher globale Änderung der TP-Rezeptor-Konformation durch Depolarisation hindeutet.

Dazu passen unsere Befunde zur Spannungsabhängigkeit verschiedener TP-Rezeptor-Mutanten. Der TP-Rezeptor wurde an verschiedenen - laut der Literatur für die Liganden-Bindung wichtigen - Stellen mutiert, *Abbildung 5-9B-E* (Funk *et al.*, 1993; Chiang *et al.*, 1996; D'Angelo *et al.*, 1996; Khasawneh *et al.*, 2006). Alle diese Mutanten zeigten eine Aktivierung bei Depolarisation, wie sie zuvor schon für TP-Rezeptor-wt beobachtet wurde und ergaben keinen Hinweis auf eine spezifische Modulation der Spannungsabhängigkeit.

Die Mutation von R295^{7,40} - einer Aminosäure, die als Interaktionspartner für die C1-Carboxylgruppe von Prostanoiden hypothetisiert und in Strukturanalysen bestätigt wurde (Sugimoto *et al.*, 1992; Audet

et al., 2019; Fan *et al.*, 2019; Toyoda *et al.*, 2019) - zu Lysin führte zu einem um etwa zwei Zehnerpotenzen nach rechts verschobenen EC_{50} (von 2 nM auf 415 nM), *Abbildung 5-10B* und zeigte interessanterweise eine Zunahme des Spannungseffektes, *Abbildung 5-10C*. Das Entfernen der Ladung an R295^{7,40} durch Mutation zu Alanin führte zu einem um etwa drei Zehnerpotenzen nach rechts verschobenen EC_{50} (von 2 nM auf 3557 nM), *Abbildung 5-10B*. Beide Mutanten wiesen eine Ausweitung der relevanten Membranspannungen in den positiven Bereich hinein auf, *Abbildung 5-11C*.

Zu den getesteten Liganden, die eine robuste Spannungsabhängigkeit aufwiesen, zählten auch PGE₂-Ethanolamid, *Abbildung 5-7E* und PGE₂-Methylester, *Abbildung 5-7F*, die an der C1-Position substituiert waren und somit keine Ladung trugen.

Das zeigt, dass für die beobachtete Spannungsabhängigkeit am TP-Rezeptor weder die negative Ladung der Carboxylgruppe, noch die positive Ladung ihres Interaktionspartner R295^{7,40} erforderlich sind. Umgekehrt scheinen andere Eigenschaften des Arginins, als die Ladung, wie z.B.: die Kettenlänge für das Ausmaß und den Bereich der Spannungsabhängigkeit von Bedeutung zu sein.

FP-Rezeptor und EP₃-Rezeptor zeigten bei der Depolarisation eine ähnliche Aktivierung wie der TP-Rezeptor - überraschenderweise zeigte der IP-Rezeptor keine nachweisbare Spannungsabhängigkeit.

Die Depolarisation des Membranpotentials verstärkte die über FP-Rezeptor, EP₃-Rezeptor und TP-Rezeptor vermittelten Signale, während die IP-Rezeptor induzierten Signale nicht beeinflusst wurden.

Die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des IP-Rezeptors erfolgte durch eine FRET Messung unter gleichzeitiger Kontrolle der Membranspannung mittels *Patch-Clamp* Technik. Als Maß für die Rezeptor-Aktivität diente die Messung der cAMP Produktion. Hierfür wurden die gemessenen Zellen mit dem Epac1-cAMP Sensor und IP-Rezeptor transfiziert. Der Epac1-cAMP Sensor-FRET-Assay wurde in dieser Studie neu zur Messung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs etabliert. Es zeigte sich, dass selbst für den schwach spannungsabhängigen β_2 AR (Birk *et al.*, 2015) ein deutliche Signalabnahme bei Depolarisation beobachtet werden konnte, *Abbildung 5-14B* links. Für den TP-Rezeptor konnte in diesem Assay eine Aktivierung durch Depolarisation, in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen, gezeigt werden, *Abbildung 5-14B* rechts. Folglich wies der Epac1-cAMP Sensor Assay eine hohe Empfindlichkeit für Änderung der Rezeptoraktivität und somit eine gute Eignung für Messungen der Spannungsabhängigkeit von GPCRs auf. Für den IP-Rezeptor konnte bei vergleichbaren Messungen keine Spannungsabhängigkeit gezeigt werden. Ein Cluster von bestimmten GPCRs zusammen mit Effektoren als Grundlage der verschleierte Spannungsabhängigkeit von IP-Rezeptor in diesem Assay erscheint unwahrscheinlich, da der IP-Rezeptor bei Agonistgabe cAMP produzierte und für die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit überexprimiert wurde.

Eine Spannungsabhängigkeit des IP-Rezeptors, lässt sich auf Grundlage unserer Befunde nicht völlig ausschließen. Sollte der IP-Rezeptor eine von uns nicht detektierte Spannungsabhängigkeit aufweisen, so

ist diese entweder viel geringer als für die Restlichen von uns untersuchten Prostanoid-Rezeptoren, oder spricht nur auf andere Agonisten an, die von uns nicht getestet wurden.

Im Allgemeinen ist die Feststellung, dass Depolarisation die Signalübertragung von Prostanoid-Rezeptoren verbessert von besonderem Interesse, da Prostanoid-Rezeptoren im menschlichen Körper weit verbreitet sind und die potenzielle Auswirkung der Spannungsabhängigkeit der Prostanoid-Rezeptoren möglicherweise nicht auf erregbare Zellen beschränkt sind. Studien zeigen Veränderungen des Membranpotentials über die Zeit in Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen, sowie in Tumorzellen. Außerdem weisen unterschiedliche differenzierte Zellen verschiedene Membranpotentiale auf (Arcangeli *et al.*, 1995; Yang and Brackenbury, 2013). Ein Beispiel für differenzierte Zellen mit starken Unterschieden im V_M sind Leberzellen mit einem V_M von -40 mV (Graf and Petersen, 1978) gegenüber Skelettmuskelzellen mit einem V_M von -90 mV (Bilbrey *et al.*, 1973). Darüber hinaus wurde für Thrombozyten, in denen sowohl der TP-Rezeptor als auch der IP-Rezeptor eine Rolle spielt (Woodward *et al.*, 2011) und die unterschiedliche spannungsabhängige Ionenkanäle exprimieren (Mahaut-Smith, 2012), gezeigt, dass physiologische Veränderungen des Membranpotentials auftreten (Krotz *et al.*, 2004).

Der Befund ist weiterhin dahingehend bemerkenswert, als das TP-Rezeptor und IP-Rezeptor als physiologische Gegenspieler bekannt sind (Woodward *et al.*, 2011). Depolarisation steigert die EP₃-Aktivität, nicht aber die IP-Rezeptor-Aktivität in Gegenwart von Iloprost. Daher könnte es möglicherweise in anschließenden Untersuchungen von Interesse sein, Unterschiede zwischen diesen Rezeptoren, insbesondere im Bereich der Bindetasche des Liganden, zu suchen. Ein mögliches Vorgehen wäre das gezielte Austauschen von Rezeptorstücken (Bildung von Rezeptor-Chimären) und deren Untersuchung auf Spannungsabhängigkeit. In diesem Zusammenhang wäre auch die Spannungsabhängigkeit des EP₁-Rezeptors von Interesse, da dessen Affinität für Iloprost der Affinität des IP-Rezeptors entspricht (Abramovitz *et al.*, 2000).

Eine wichtige offene Frage zur Spannungsabhängigkeit von GPCRs ist, neben dem bis heute ungeklärten zugrundeliegenden Mechanismus, die Frage, ob und wenn ja, welche Rolle die Spannungsabhängigkeit in der GPCR vermittelten Physiologie, Pathophysiologie und Pharmakologie spielt. Zur Beantwortung dieser Frage wären neben Untersuchungen in einzelnen nativen Zellen auch Untersuchungen in Organsystemen oder ganzen Organismen notwendig. Untersuchungen einzelner Zellen unter dem Aspekt der Spannungsabhängigkeit sind, wie in dieser Studie geschehen, gut mit der etablierten *Patch-Clamp* Technik durchzuführen. Eine Modulation von V_M in Gewebe und Organen ist in bestimmten Fällen mit Hochkalium möglich, stellt aber einen starken Eingriff in die Umgebung der Zellen dar und kann Effekte auf die Funktion von Ionenkanälen, den Calciumhaushalt und über längere Zeit auch Effekte auf die Zellproliferation und weitere unerwünschte Effekte haben. Gleichzeitig erfolgt bei dieser Form der Messung keine exakte Kontrolle des V_M . Zusammen genommen machen diese

Aspekte eine Untersuchung mit Depolarisation durch Hochkalium schwierig und begrenzen ihre Aussagekraft.

Ein Ansatz bei dem GPCRs, deren Spannungsabhängigkeit für endogene Liganden durch Mutation aufgehoben wurde, während sie gleichzeitig ihre Affinität und Fähigkeit G-Proteine zu aktivieren beibehalten, über einen Gen-Knock-in z.B. in Mäuse eingebracht wird, könnte hier erfolgsversprechender sein. Diese Tiere könnten auf einen entsprechenden Phänotyp untersucht und für Experimente genutzt werden, ohne eine artifizielle Umgebung zu erzeugen. Da Prostanoid-Rezeptoren im menschlichen Körper weit verbreitet sind und zahlreiche wichtige Funktionen übernehmen, gibt es auch sehr unterschiedliche mögliche Experimente um die Rolle des V_M in Physiologie und Pathophysiologie aufzuklären. Ein interessanter Aspekt könnte möglicherweise die Untersuchung der Rolle der Spannungsabhängigkeit von Prostanoid-Rezeptoren bei Krebs sein, da Prostanoid-Rezeptoren bei bestimmten Tumorarten eine Rolle spielen und Tumorzellen im Rahmen ihrer Entartung depolarisieren (Yang and Brackenbury, 2013), was nach unserer Beobachtung zu einer Verstärkung der Prostanoid-Rezeptor vermittelten Signale, bis auf der von IP-Rezeptor, führen müsste.

Der entscheidende erste Schritt für einen solchen Gen-Knock-in stellt die Generierung eines spannungsinsensitiven Rezeptors dar. In der Vergangenheit konnten für MACHRs und mGluRs unterschiedliche Polaritäten der Spannungsabhängigkeit beschrieben werden und anschließend mit Hilfe der Bildung von Rezeptor-Chimären umgekehrt werden (Ben-Chaim *et al.*, 2006; Ohana *et al.*, 2006; Hoppe *et al.*, 2018). Daher ist es durchaus möglich, dass ein solches Vorgehen auch für die von uns untersuchten Prostanoid-Rezeptoren erfolgreich sein kann, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der von uns beobachteten unterschiedlichen Spannungsabhängigkeit des IP-Rezeptors gegenüber den anderen Prostanoid-Rezeptoren und am Ende z.B. ein spannungsunabhängiger TP-Rezeptor generiert werden kann. Da die Spannungsabhängigkeit ihre Wirkung auf die Rezeptor-Liganden-Interaktion entfaltet ist es ebenfalls nicht auszuschließen, dass eine solche Mutante stark veränderte Affinitäten für die endogenen Liganden aufweist. Dies müsste dann vor weitergehenden Untersuchungen überprüft werden.

Insgesamt ist die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs und Prostanoid-Rezeptoren im Speziellen methodisch anspruchsvoll, was die Geschwindigkeit der Forschung limitiert und gleichzeitig fehlen offensichtliche Angriffspunkte, wie z.B. ein kanonischen Spannungssensor, was die Arbeit zusätzlich erschwert. Die weitere Forschung bleibt eine Herausforderung, die aber aufgrund der möglichen Relevanz in Physiologie, Pathophysiologie und Pharmakologie unbedingt weiterverfolgt werden sollte. Dafür bietet diese hier vorliegende Untersuchung eine solide Grundlage.

5.2.1.1 Keine Spannungsabhängigkeit für PAR1 detektierbar

In dieser Arbeit wurde die Spannungsabhängigkeit des PAR1 untersucht. Hierzu wurde PAR1 zusammen mit dem $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay transfiziert. Diese Assay ist, aufgrund seiner Amplifikation und guten Auflösung, in der Lage auch kleine Änderungen der Rezeptor-Aktivität sichtbar zu machen. Die PAR1-Aktivierung erfolgte irreversibel durch Applikation von Thrombin und führte zu einem transienten FRET-Signal, *Abbildung 5-16B*. Die Depolarisation während der Signalabnahme, *Abbildung 5-16C*. Es konnte keine Spannungsabhängigkeit für PAR1 in diesem sehr sensitiven FRET Assay detektiert werden, *Abbildung 5-16C*. Aufgrund der 1:1 Stöchiometrie zwischen Rezeptor und angeheftetem Liganden kann in diesem Assay lediglich eine Änderung der intrinsischen Aktivität, nicht jedoch eine Änderung der Affinität untersucht werden. Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen. In der Arbeit von Albarrán et al. 2013 wurde eine Spannungsabhängigkeit von PAR1 und PAR4 in menschlichen Thrombozyten, sowohl bei Aktivierung durch FIIa als auch bei Aktivierung mit dem Agonistpeptid TFLLR beschrieben (Albarrán *et al.*, 2013). Als Maß für die Rezeptor-Aktivität dienten Messungen von Calcium-Spiegeln und die Depolarisation erfolgte mittels Gabe einer hoch konzentrierten Kalium Lösung. Im Gegensatz zu dieser Arbeit haben wir das Membranpotential der Zellen nicht indirekt mittels hoch Kalium, sondern viel exakter mittels *Patch-Clamp* Technik kontrolliert. Weiterhin ist zu bemerken, dass Calciumspiegel nicht linear mit der Rezeptor-Aktivität verbunden sind und unter anderem von der Füllung intrazellulärer Calciumspeicher abhängen.

6 Daltroban – ein ungewöhnlicher Ligand

6.1 Ergebnisse

6.1.1 Transiente $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktion bei TP Rezeptor Aktivierung mit Daltroban

Für verschiedene GPCRs wurde eine Liganden-spezifische Spannungsabhängigkeit nachgewiesen. Insbesondere für Partialagonisten konnte eine Modulation der intrinsischen Aktivität durch Änderung der Membranspannung gezeigt werden, u.a. in: (Rinne *et al.*, 2013). Für den TP-Rezeptor gibt es keinen prominenten Partialagonisten. In der Literatur gab es verschiedene Hinweise auf einen Partialagonismus von Daltroban (Miki *et al.*, 1992; Bertolino *et al.*, 1995; Valentin *et al.*, 1997), eine Substanz die ursprünglich von Böhringer Mannheim in den 1980er Jahren als nicht-prostanoiden TP-Rezeptor Antagonist entwickelt wurde und schließlich in der klinischen Erprobung scheiterte (John *et al.*, 1998).

Daltroban wurde zunächst in der TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktion in HEK293T-Zellen getestet. Dieser FRET-Assay weist eine gute Auflösung, sowie eine Amplifikation auf, wodurch auch die Wirkung schwacher Partialagonisten detektiert werden kann. Bei diesem FRET-Assay kommt es bei Aktivierung des TP-Rezeptors zu einer Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115, was zu einem Anstieg des FRET, sichtbar am Anstieg der YFP/CFP Emissionsratio, führt. Die Applikation von 100 μ M Daltroban führte zu einem Anstieg des FRET-Signals, *Abbildung 6-1A*. Nach initialen Maximum von $71\% \pm 6\%$ (bezogen auf die von 3 μ M U46619 hervorgerufene FRET-Antwort), *Abbildung 6-1B*, kam es mit einer gemessenen Halbwertszeit von $12,2\text{ s} \pm 2,0\text{ s}$, *Abbildung 6-1C*, zu einer Abnahme von $85\% \pm 3\%$ des Signals, *Abbildung 6-1D*, bis ein stabiles Plateau erreicht wurde. Das Minimum des durch Daltroban hervorgerufenen Signals, gemessen vor Ende der Applikation, lag bei $9\% \pm 2\%$, *Abbildung 6-1E*. Dieses Restsignal konnte durch Puffergabe ausgewaschen werden, so dass wieder die Basislinie erreicht wurde. Die Einzelkanal-Fluoreszenzen waren gegenläufig, *Abbildung 6-1A*. Der TP-Rezeptor aktiviert mit U46619, untersucht in der gleichen FRET-Interaktion, zeigte hingegen keine transiente Aktivierung, *Abbildung 6-1F*.

Da die transiente Rezeptoraktivierung durch Daltroban unerwartet und der Grund hierfür unklar war, wurde der Effekt von Daltroban auf den TP-Rezeptor im Folgenden weiter untersucht.

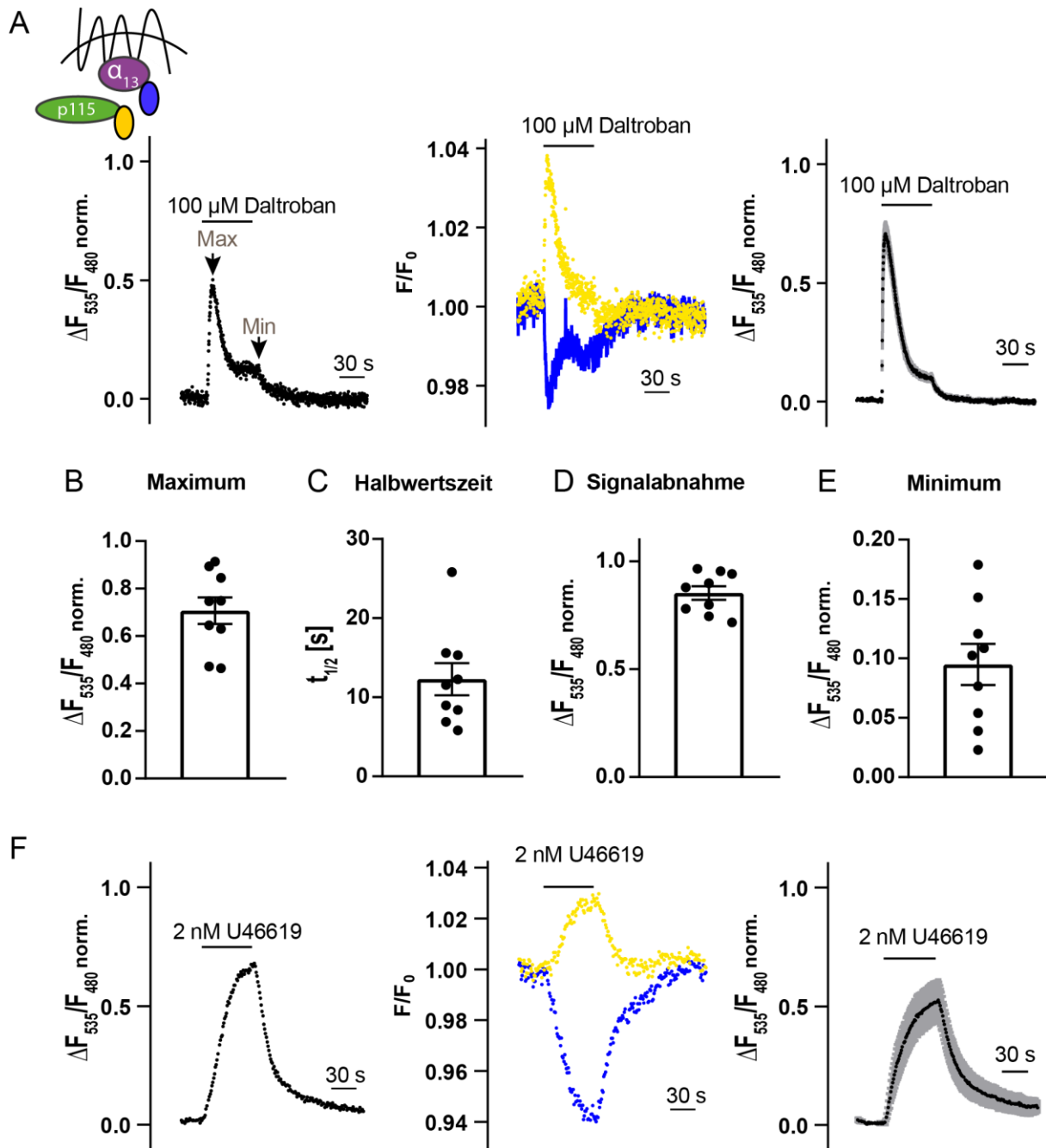


Abbildung 6-1 Transiente TP-Rezeptor induzierte Ga_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion in Gegenwart von Daltroban. FRET Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die Ga_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert. (A) Links: Repräsentative Messung, bei Gabe von 100 μ M Daltroban. Mitte: Zeigt die entsprechenden Emissionen von CFP (in blau) und YFP (in gelb). Rechts: Gemittelte Daten der Emissionsratio aus Messungen, die entsprechend dem gezeigten Protokoll durchgeführt wurden ($n = 9$; Mittelwerte \pm SEM). (B)-(E): Angegeben sind jeweils Mittelwerte \pm SEM, $n = 9$. (B) Durch Daltroban hervorgerufenenes Maximum der Emissionsratio, normalisiert auf die Antwort von 3 μ M U46619 ($71\% \pm 6\%$). (C) Halbwertszeit der Signalabnahme der von Daltroban hervorgerufenen FRET Antwort ($12,2 \text{ s} \pm 2,0 \text{ s}$). (D) Signalabnahme in % Ausgehend vom Maximum ($85\% \pm 3\%$) (E) Erreichtes Minimum vor

Auswaschen, normalisiert auf die Antwort von 3 μM U46619 ($9\% \pm 2\%$). (F) Messungen analog zu (A). Es wurden 2 nM U46619 appliziert ($n = 7$; Mittelwerte \pm SEM).

6.1.2 Transiente TP-Rezeptor Aktivierung durch Daltroban in HeLa Zellen

Um zu überprüfen, ob die beobachtete transiente Interaktion von Ga_{13} mit p115 durch Aktivierung von TP-Rezeptor mit Daltroban spezifisch für HEK293-Zellen war, wurde das durchgeführte FRET-Experiment analog in HeLa Zellen wiederholt. Auch hier konnte ein transienter Anstieg der Emissionsratio beobachtet werden, *Abbildung 6-2*. Diese Untersuchung ist noch nicht abgeschlossen, da nur Zellen einer Transfektion gemessen wurden und sollte daher in Zukunft wiederholt werden.

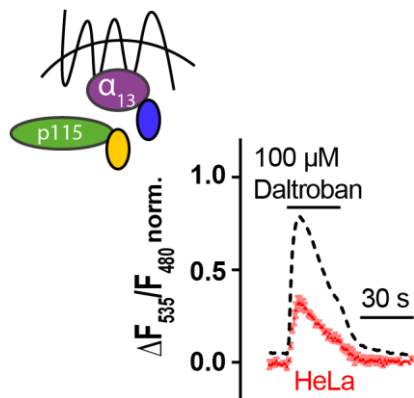


Abbildung 6-2 Transiente TP-Rezeptor induzierte Ga_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion in Gegenwart von Daltroban in HeLa Zellen. Mittelwerte \pm SEM von FRET-Messungen einzelner HeLa-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die Ga_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μM U46619 normiert ($n = 4$). Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsratio bei Daltroban Gabe von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die ebenfalls mit dem FRET-basierten Biosensor für die Ga_{13} -p115-RhoGEF-

Interaktion und dem TP-Rezeptor-wt transfiziert worden waren, aus *Abbildung 6-4A*, gezeigt.

6.1.3 TP Rezeptor aktiviert mit Daltroban führt zu transienter Ga_q -Aktivierung, sowie transienter Interaktion von TP-Rezeptor mit Ga_{13} und mit GRK2

Hierbei zeigte sich, dass auch die Aktivierung von Ga_q durch den TP-Rezeptor transient war, wenn der TP-Rezeptor mit Daltroban aktiviert wurde, *Abbildung 6-3A*. Hier konnte eine stabile Aktivierung durch U46619 in denselben Zellen beobachtet werden, *Abbildung 6-3A*. Interessanterweise führte die Applikation von Daltroban auch nach anschließendem dreiminütigem Auswaschen mit Puffer zu einem vermindertem Ansprechen (Reduktion um $70\% \pm 7\%$) des TP-Rezeptors auf U46619, *Abbildung 6-3A*. Im Vergleich dazu zeigten Kontrollmessungen, bei denen Puffer statt Daltroban appliziert wurde, keinen signifikanten Unterschied zwischen erster und zweiter U46619 Gabe.

Diese Beobachtungen konnten analog für die durch Daltroban induzierte Interaktion von TP-Rezeptor und GRK2 (Reduktion um $62\% \pm 6\%$), *Abbildung 6-3B*, und für die Interaktion von TP-Rezeptor und Ga_{13} , *Abbildung 6-3C* (Reduktion um $69\% \pm 6\%$), gemacht werden. Beide FRET-Assays weisen keine Amplifikation auf und spiegeln so direkter die Rezeptoraktivität wider. Für die

TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion erfolgte nach der zweiten Applikation von U46619 eine dritte und vierte Gabe, *Abbildung 6-3C*. Bei der dritten Gabe betrug die Reduktion des Ansprechens auf U46619 noch $60\% \pm 3\%$ ohne signifikanten Unterschied zur zweiten Gabe. Bei der vierten Gabe betrug der Wert $67\% \pm 6\%$. Gleichzeitig wies die vierte Gabe auch bei der Kontrolle eine reduzierte Antwort (Reduktion um $17\% \pm 6\%$, nicht signifikant) gegenüber der ersten Applikation auf.

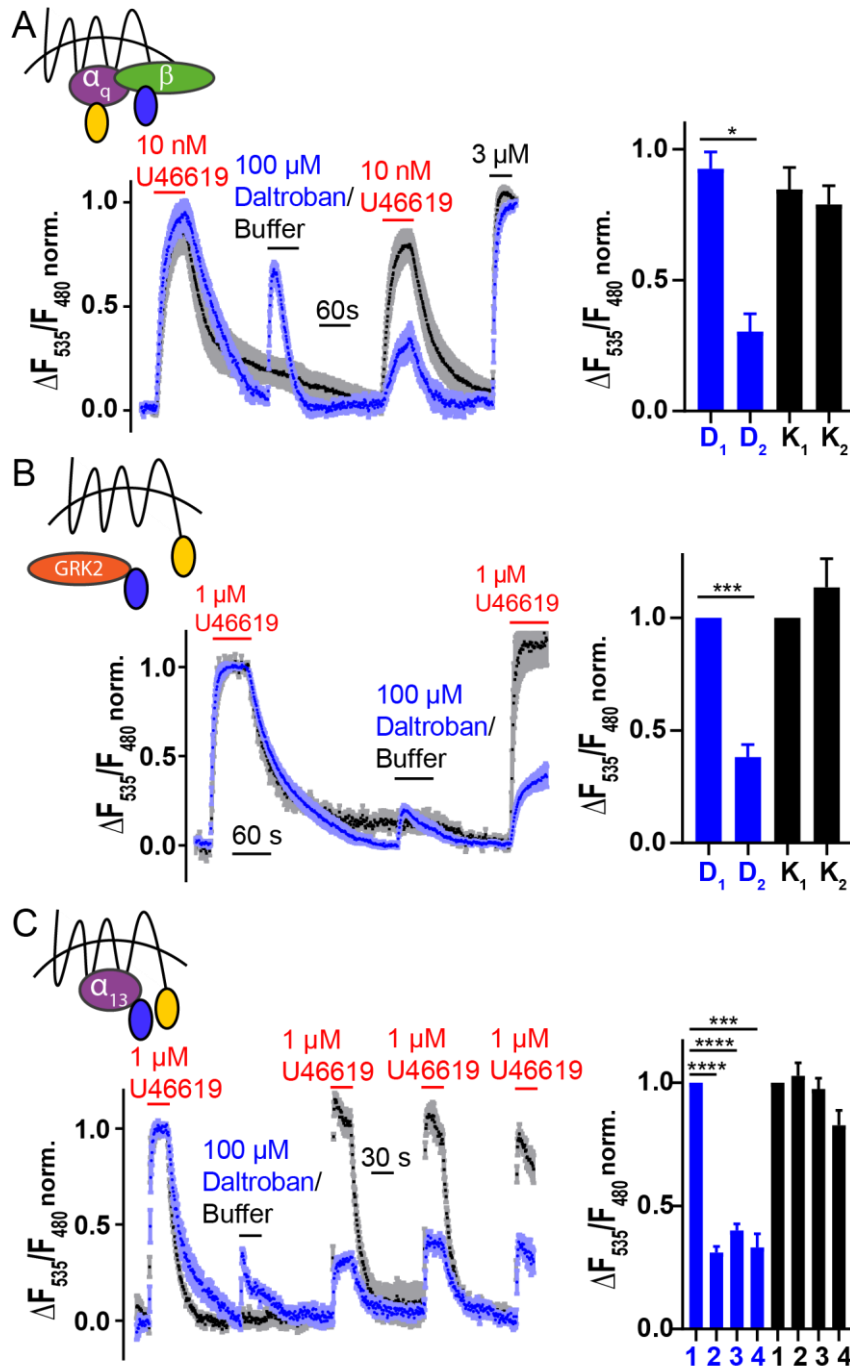


Abbildung 6-3 Transiente Aktivierung verschiedener TP-Rezeptor Signalwege durch Gabe von Daltroban und anschließender reduzierter Antwort auf U46619 FRET Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die dem jeweils angegebenen FRET-basierten Biosensor transfiziert wurden. Daten von Zellen, die mit Daltroban behandelt wurden, sind in blau dargestellt. Für Kontrollmessungen wurde Daltroban durch Puffer ersetzt, die entsprechenden Messungen wurden in schwarz dargestellt. Die Applikationen, deren Amplituden verglichen wurden sind, in Rot dargestellt. (A) G_{α_q} -Aktivierungs-Assay. Links: Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert ($n = 7$ pro Bedingung; Mittelwerte \pm SEM). Rechts: Vergleich der Antwort auf 10 nM U46619 bei erstmaliger und zweimaliger Applikation, mit und ohne Daltroban Gabe vor der

zweimaligen Applikation ($D_1 = 0,93 \pm 0,06$ vs $D_2 = 0,30 \pm 0,07$: $*p = 0,01$; $K_1 = 0,85 \pm 0,08$ vs $K_2 = 0,79 \pm 0,07$: $p = 0,81$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Mittelwerte \pm SEM). (B) TP-Rezeptor-GRK2-Interaktions-Assay. Links: Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die erste Amplitude einer Referenzkonzentration von $1 \mu\text{M}$ U46619 normiert ($n = 5$ pro Bedingung; Mittelwerte \pm SEM). Rechts: Vergleich der Antwort auf $1 \mu\text{M}$ U46619 bei erstmaliger und zweimaliger Applikation, mit und ohne Daltroban Gabe vor der zweimaligen Applikation ($D_1 = 1,00 \pm 0,00$ vs $D_2 = 0,38 \pm 0,06$: $***p = 0,0004$; $K_1 = 1,00 \pm 0,00$ vs $K_2 = 1,36 \pm 0,13$: $p = 0,34$; Gepaarter t -Test, Mittelwerte \pm SEM). (C) TP Rezeptor $G_{\alpha_{13}}$ -Interaktions-Assay. Links: Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die erste Amplitude einer Referenzkonzentration von $1 \mu\text{M}$ U46619 normiert ($n = 5$ pro Bedingung; Mittelwerte \pm SEM). Rechts: Vergleich der Antwort auf $1 \mu\text{M}$ U46619 bei erstmaliger Applikation mit der Antwort auf drei folgende Applikationen, mit und ohne Daltroban Gabe vor der zweimaligen Applikation (Vergleich $D_1 = 1,00 \pm 0,00$ mit $D_2 = 0,31 \pm 0,06$, $D_3 = 0,40 \pm 0,03$, $D_4 = 0,33 \pm 0,06$: $****p < 0,0001$, RM einfaktorielle Varianzanalyse; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Zusammenfassung angepasster p -Werte: $D_1:D_2****p < 0,0001$; $D_1:D_3****p < 0,0001$; $D_1:D_4***p = 0,0006$; Vergleich $K_1 = 1,00 \pm 0,00$ mit $K_2 = 1,03 \pm 0,05$, $K_3 = 0,97 \pm 0,04$, $K_4 = 0,83 \pm 0,06$: $p = 0,27$, Kruskal-Wallis Test).

6.1.4 Daltroban führt zu einer transienten Konformationsänderung des TP-Rezeptors

Neben Daltroban gibt es weitere nicht prostanoid TP-Rezeptor Antagonisten, die Daltroban strukturell ähneln. Eine dieser Substanzen ist Ramatroban, ein Thromboxan-Rezeptor Antagonist, der in Japan zur Behandlung der allergischen Rhinitis zugelassen ist (Fan *et al.*, 2019). Sowohl Ramatroban, als auch Daltroban weisen eine Carboxylgruppe und eine Halogenbenzulfonamid Komponente auf. Auf HEK293T-Zellen, die mit dem TP-Rezeptor induzierten $G_{\alpha_{13}}$ -p115 Interaktions-Assay transfiziert waren, wurde Ramatroban appliziert. Im Anschluss wurde mit Puffer ausgewaschen und Daltroban appliziert, *Abbildung 6-4A(a)*.

Hierbei zeigte sich ein Maximum der Emissionsratio für Ramatroban bei $27\% \pm 4\%$ und für Daltroban bei $73\% \pm 5\%$ der durch $3 \mu\text{M}$ U46619 hervorgerufen Änderung der Emissionsratio, *Abbildung 6-4A(b)*. Innerhalb von 30 Sekunden kam es für Ramatroban zu einer Reduktion der Emissionsratio um $21\% \pm 3\%$, wohingegen die Reduktion für Daltroban $65\% \pm 4\%$ betrug, *Abbildung 6-4A(c)*. Die Emissionsratio nach 30 sekundiger Applikation war für Daltroban geringfügig, aber signifikant größer als für Ramatroban ($26\% \pm 4\%$ Daltroban; $21\% \pm 3\%$ Ramatroban), *Abbildung 6-4A(d)*.

Um mehr über die direkte Wirkung von Ramatroban und Daltroban auf den TP-Rezeptor zu erfahren, wurden FRET-Messung in Platten mit HEK293-Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten, durchgeführt. Dies geschah als Auftragsarbeit durch die Firma LWL-Lab, Düsseldorf. Alle nachfolgend gezeigten FRET-Messungen multipler Zellen wurden ebenfalls als Auftragsarbeit von der Firma LWL-Lab durchgeführt. Der TP-Rezeptor-Sensor ist im Rahmen dieser Arbeit entstanden und im Abschnitt 5.1.1.1 vorgestellt worden. In den TP-Rezeptor wurde in die ICL3 ein eYFP eingefügt und am C-Terminus ein mTurquoise2 eingebracht. Durch die Konformationsänderung des Rezeptors insbesondere

die Auswärtsbewegung von TM6, kommt es zu einer Änderung der Emissionsratio des TP-Rezeptor-Sensors. Wurde der TP-Rezeptor mit Daltroban aktiviert, konnte bei den durchgeführten Messungen eine transiente Konformationsänderung beobachtet werden, *Abbildung 6-4B*. Nach der initialen transienten Phase, konnte ein Plateau beobachtet werden, das sich in seiner Amplitude nur marginal von der initialen Konformationsänderung unterschied. Eine Aktivierung mit Ramatroban führte zu einer Konformationsänderung ohne detektierbare transiente Komponente, *Abbildung 6-4B*. Im Plateau waren die Amplitude, der durch Daltroban und Ramatroban hervorgerufenen Emissionsratio Änderungen nicht unterscheidbar, *Abbildung 6-4B*. Der Vergleich der Kinetik der Deaktivierung am TP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 6-4B*, und der TP-Rezeptor- α_{13} -Interaktion, *Abbildung 6-3C*, nach drei Sekunden langer Daltroban Gabe, stimmte zeitlich überein und wies keinen signifikanten Unterschied auf, *Abbildung 6-4C*.

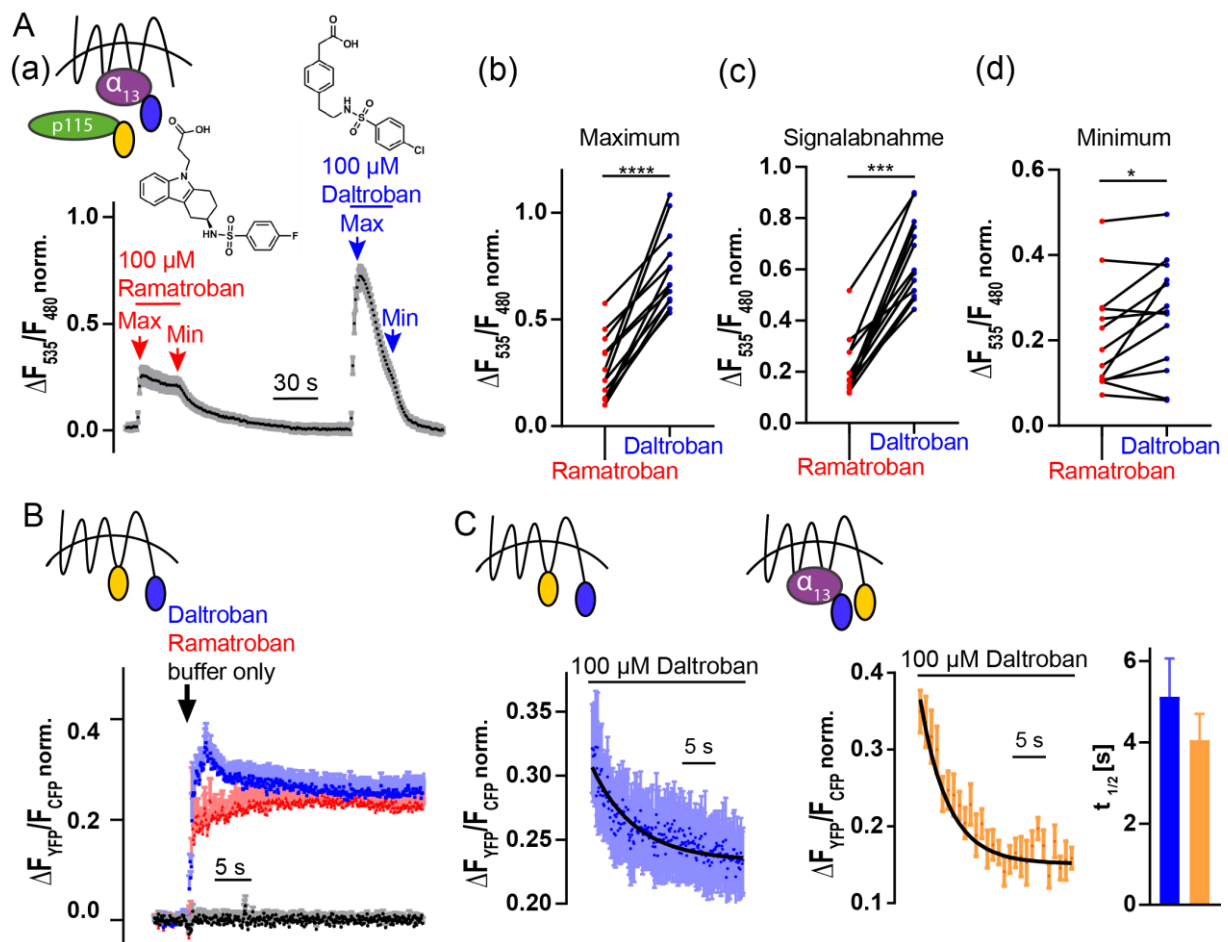


Abbildung 6-4 Daltroban bewirkt eine transiente Änderung der TP-Rezeptor-Konformation Mittelwerte \pm SEM (A) (a) FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die Ga_{13} -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert wurden. Die Strukturformel der applizierten Liganden wurde über den Applikationsbalken gezeigt. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μM U46619

normiert ($n = 13$). (b) Vergleich der Maxima zwischen der Ramatroban und Daltroban Applikation (Ramatroban = $27\% \pm 4\%$; Daltroban $73\% \pm 5\%$ **** $p < 0,0001$ gepaarter t-Test, Mittelwerte \pm SEM). (c) Vergleich der Signalabnahme ausgehend vom Maximum zwischen der Ramatroban und Daltroban Applikation (Ramatroban = $21\% \pm 3\%$, Daltroban = $65\% \pm 4\%$: *** $p = 0,0002$; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Mittelwerte \pm SEM). (d) Vergleich der Minima zwischen der Ramatroban und Daltroban Applikation (Ramatroban = $21\% \pm 3\%$; Daltroban $26\% \pm 4\%$ * $p = 0,03$ gepaarter t-Test, Mittelwerte \pm SEM). (B) FRET-Messungen multipler Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von $1 \mu\text{M}$ U46619 normiert. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Injektion von Puffer oder Agonist-haltiger Pufferlösung an. Die resultierende Konzentration der entsprechenden Agonisten in den Wells nach Injektion wurde jeweils über den Pfeilen angegeben. Messungen verschiedener Experimente wurden für jede Gruppe gemittelt und aufgezeichnet. (Blau: Daltroban; Rot: Ramatroban, Schwarz: Puffer; $n = 8$ pro Bedingung; Mittelwert \pm SEM) (C) Mittelwerte \pm SEM des Zeitverlaufs der Änderung der Emissionsratio in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ Daltroban, beginnend ab der 3. Sekunde nach der Applikation für: Links: des TP-Rezeptor-Sensors (Daten aus Abbildung 6-3C, blau, $n = 6$). Mitte: TP-Rezeptor- Ga_{13} -Interaktion (Daten aus Abbildung 6-4B, orange, $n = 5$). Rechts: Die anhand der gefitteten Funktionen einzelner Experimente bestimmten Halbwertszeiten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($t_{0,5}$ (TP-Rezeptor-Sensor) = $5,13 \pm 2,30 \text{ s}$, $t_{0,5}$ (TP-Rezeptor- Ga_{13} -Interaktion) = $4,06 \pm 0,65 \text{ s}$; $p = 0,66$; Mann-Whitney-Test). Eine auf Grundlage der ermittelten Parameter berechnete monoexponentielle Funktion wurde als schwarze durchgängige Linie jeweils in die entsprechende Abbildung eingezeichnet.

6.1.5 Daltroban wandelt sich in hohen Konzentrationen vom Antagonist zum Partialagonisten

Für den TP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve mittels FRET-Messung in Platten von der Firma LWL-Lab gemessen. Hierbei ergab sich ein EC_{50} von 48 nM U46619, Abbildung 6-5A. Der zuvor durch FRET-Einzelzellmessungen ermittelte EC_{50} lag bei 95 nM U46619, Abbildung 5-3B unten. Anhand des ermittelten EC_{50} von 48 nM U46619, ergab sich eine Aktivierung von 68% der Rezeptoren bei Applikation von 100 nM U46619. Der IC_{50} Wert von Daltroban für 100 nM U46619 lag bei 46 nM Daltroban, Abbildung 6-5A rechts. Im Folgenden wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem zunächst 100 nM U46619 appliziert wurden, Abbildung 6-5B. Es kam zu einer Änderung der Emissionsratio des TP-Rezeptor-Sensors. Im Anschluss wurden entweder $3,3 \mu\text{M}$ U46619 (entsprechend 99% Hemmung), Abbildung 6-5B, links oder $1 \mu\text{M}$ U46619 (entsprechend 96% Hemmung), Abbildung 6-5B, rechts hinzugegeben, wodurch die Emissionsratio des TP-Rezeptor-Sensors in beiden Fällen wieder den Ausgangswert erreichte. Entsprechend dem IC_{50} von 100 nM Daltroban in Anwesenheit von 100 nM U46619 bewirkt eine Gabe von entweder $3,3 \mu\text{M}$ Daltroban oder $1 \mu\text{M}$ Daltroban eine Reduktion der Emissionsratio von 99% bzw. 96%. Im Anschluss erfolgte in beiden Konditionen eine Gabe von $100 \mu\text{M}$ Daltroban. Es kam in beiden Fällen zu einer Änderung der Emissionsratio, wie zuvor in für Experimente mit $100 \mu\text{M}$ Daltroban, ohne Vorbehandlung mit einer niedrigen Konzentration Daltroban beobachtet, Abbildung 6-4B.

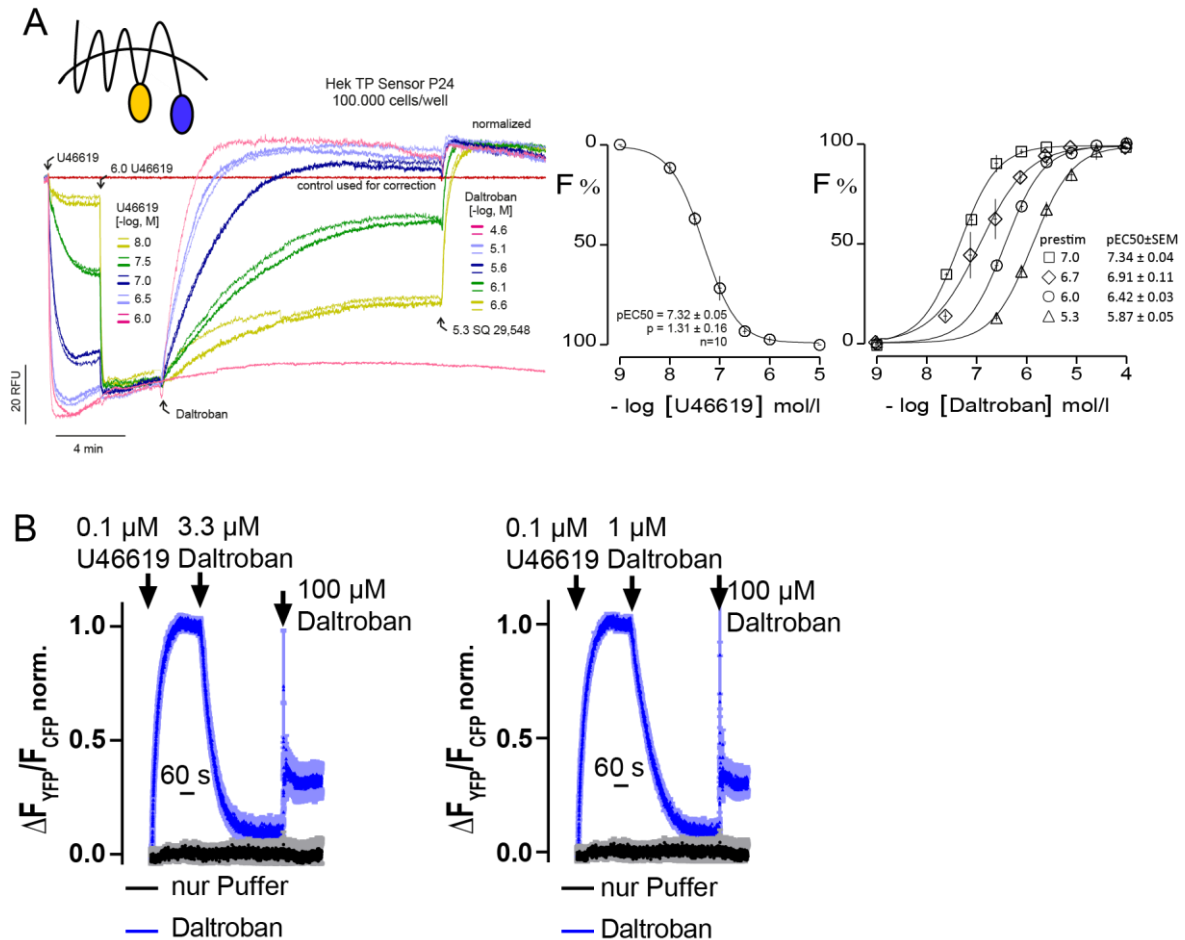


Abbildung 6-5 Daltroban wandelt sich in hohen Konzentrationen vom Antagonisten zum Partialagonisten (A) und (B) FRET-Messungen multipler Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 1 μM U46619 normiert. (A) Links: Repräsentative Messungen für eine TP-Rezeptor-Sensor Konzentrations-Wirkungs-Kurve Mitte: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für U46619 Rechts: Hemmkurven mit Daltroban. Mit „prestim“ ist jeweils die Konzentration von U46619 angegeben, für die jeweils eine Hemmkurve mit Daltroban aufgenommen wurde. (B) Die Pfeile geben die Zeitpunkte der Injektionen von Puffer oder der entsprechenden Agonist-haltigen Pufferlösung an. Die resultierende Konzentration der entsprechenden Agonisten in den Wells nach Injektion wurde jeweils über den Pfeilen angegeben. Links: Gabe von Daltroban, so dass eine Konzentration von 3,3 μM in den Wells resultierte. Blau: Daltroban; Schwarz: Puffer ($n = 11$; für beide Experimente wurden die gleichen Kontrollen verwendet); Links: ($n = 10$ Mittelwerte $\pm SEM$). Rechts: Gabe von Daltroban, so dass 1 μM in den Wells resultierte (Blau: Daltroban $n = 12$; Mittelwerte $\pm SEM$).

6.1.6 Keine Auswaschbarkeit der reduzierten Antwort auf U46619 nach Daltroban Gabe

Die Applikation von Daltroban reduzierte die Aktivierbarkeit des TP-Rezeptors durch U46619 in verschiedenen FRET-Assays 6.1.3, auch wenn nach Daltroban Gabe je nach Assay 120 s - 180 s mit Puffer ausgewaschen wurde. In einer Untersuchung dieses Phänomens am TP-Rezeptor-Sensor führte

die Applikation von Daltroban auch nach anschließendem 120 s langem Auswaschen mit Puffer zu einer verminderten Antwort auf die Gabe von U46619 (Reduktion um $80\% \pm 9\%$), *Abbildung 6-6A*. Im Vergleich dazu zeigten Kontrollmessungen, bei denen Puffer statt Daltroban appliziert wurde, keinen signifikanten Unterschied zwischen erster und zweiter U46619 Gabe, *Abbildung 6-6A*. Auch eine Daltroban Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Daltroban, die in *Abbildung 6-5* einen rein hemmenden Effekt auf die TP-Rezeptor-Aktivität hatte, zeigte im Zeitraum von 120 s keine Auswaschbarkeit, *Abbildung 6-6B*. Erste Messungen mit Ramatroban, die noch weiteren Wiederholungen bedürfen, zeigten für 100 nM Ramatroban (Konzentration angepasst an die etwa zehnfach höhere Affinität für den TP-Rezeptor von Ramatroban im Vergleich zu Daltroban (Fan *et al.*, 2019)), ebenfalls keine sichtbare Auswaschbarkeit des hemmenden Effektes innerhalb von 120 s, *Abbildung 6-6C*.

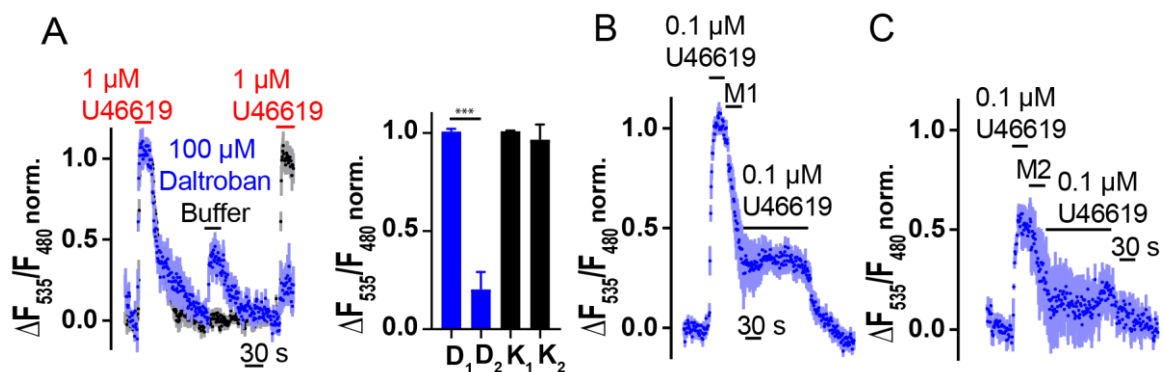


Abbildung 6-6 Untersuchung der Auswaschbarkeit des Daltroban Effektes (A) und (B) und (C) FRET-Messungen einzelner HEK293-Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten. Daten von Zellen, die mit Daltroban behandelt wurden, sind in blau dargestellt. Für Kontrollmessungen wurde Daltroban durch Puffer ersetzt, die entsprechenden Messungen wurden in schwarz dargestellt. Die Applikationen, deren Amplituden verglichen wurden, sind in Rot dargestellt. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von $1 \mu\text{M}$ U46619 für (A) bzw. $3 \mu\text{M}$ U46619 für (B) und (C) normiert. (A) Zellen, auf die Daltroban appliziert wurde, sind blau dargestellt. Zur Kontrolle wurde Daltroban durch Puffer ersetzt, dargestellt in schwarz ($n = 5$ pro Bedingung; Mittelwerte \pm SEM). Rechts: Vergleich der Antwort auf $1 \mu\text{M}$ U46619 bei erstmaliger und zweimaliger Applikation, mit und ohne Daltroban Gabe vor der zweimaligen Applikation ($D_1 = 1,00 \pm 0,00$ vs $D_2 = 0,20 \pm 0,09$: $***p = 0,0006$; $K_1 = 1,00 \pm 0,00$ vs $K_2 = 0,97 \pm 0,08$: $p = 0,60$; Gepaarter t -Test, Mittelwerte \pm SEM). (B) Die Mischung M1 enthielt $3 \mu\text{M}$ Daltroban und $0,1 \mu\text{M}$ U46619 ($n = 7$; Mittelwerte \pm SEM). (C) Die Mischung M2 enthielt $0,1 \mu\text{M}$ Ramatroban und $0,1 \mu\text{M}$ U46619 ($n = 4$; Mittelwerte \pm SEM).

6.1.7 Effekt verschiedener Halogenbenzensulfonamide auf die TP-Rezeptor-Aktivität

Von Lukas Heyder, Mitarbeiter der AG Diederich aus der Philipps-Universität Marburg, wurden die Ramatroban-Analoga LHX445 und LHX447, sowie das Daltroban-Analogon LHX467 synthetisiert, *Abbildung 6-7*.

LHX445 unterschied sich von Ramatroban durch die Öffnung eines Ringes, durch Wegnahme von zwei C-Atomen, hervorgehoben durch die roten Pfeile *Abbildung 6-7*. LHX447 unterschied sich von LHX445 nur durch die Substitution des Halogens von Fluor zu Chlor und LHX467 unterschied sich von Daltroban durch eine Substitution des Halogens von Chlor zu Fluor, *Abbildung 6-7*.

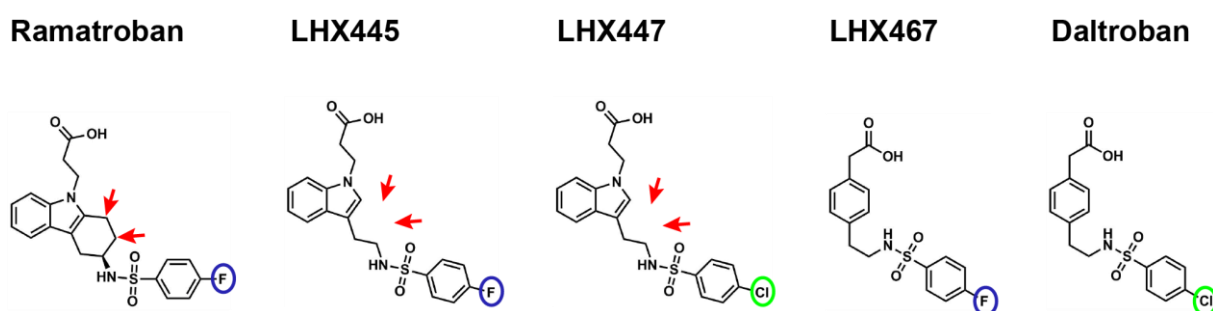


Abbildung 6-7 *Getestete Halogenbenzensulfonamide* Mit roten Pfeilen wurden die Kohlenstoffatome hervorgehoben, die für die Ramatroban-Analoga LHX445 und LHX447 entfernt wurden. Mit einem blauen Kreis wurden Fluor-Atome hervorgehoben. Mit einem grünen Kreis wurden Chlor-Atome hervorgehoben.

Diese Substanzen wurden im durch den TP-Rezeptor induziertem $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assay getestet. Die Liganden wurden jeweils für genau 60 s appliziert. Für nachfolgende kinetische Betrachtungen der Messungen wurde die Frequenz, mit der die Zellen beleuchtet bzw. die Emissionen der Einzelkanal-Fluoreszenzen akquiriert wurden auf 5 Hz erhöht. Mit diesem Protokoll wurde Ramatroban, LHX445, LHX447 und LHX467 getestet, *Abbildung 6-8A-D*. Eine Messung von Daltroban mit exakt diesem Protokoll erfolgte bereits in *Abbildung 6-1A*.

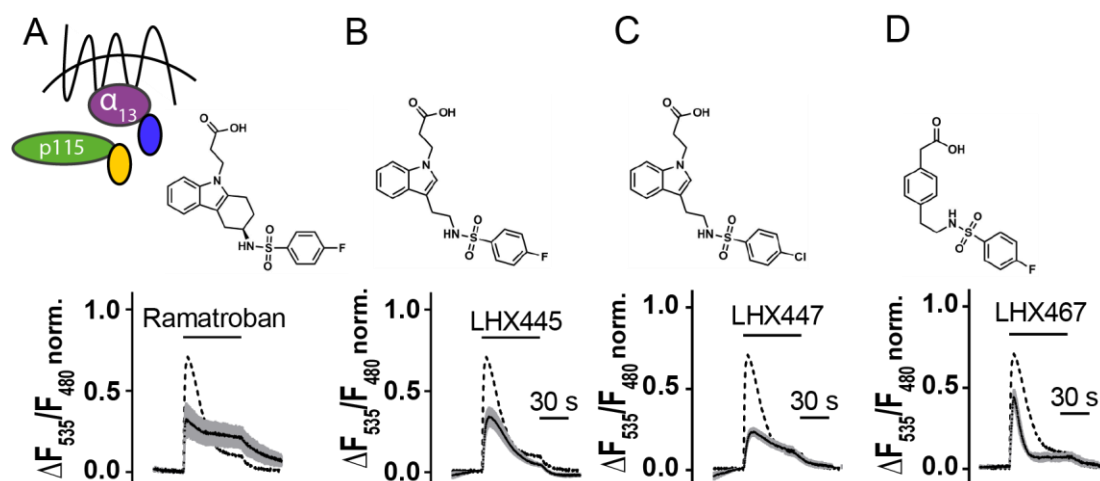


Abbildung 6-8 TP-Rezeptor-wt aktiviert mit verschiedenen Halogenbenzensulfonamiden (A)-(D) Mittelwerte \pm SEM von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G_{\alpha_{13}}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert. Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsratio bei Daltroban Gabe von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die ebenfalls mit dem FRET-basierten Biosensor für die $G_{\alpha_{13}}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und dem TP-Rezeptor-wt transfiziert worden waren, gezeigt, aus Abbildung 6-1A. Über den Messungen befindet sich jeweils die Strukturformel des untersuchten Liganden. (A) Applikation von 100 μ M Ramatroban ($n = 4$). (B) Applikation von 100 μ M LHX445 ($n = 9$). (C) Applikation von 100 μ M LHX447 ($n = 7$). (D) Applikation von 100 μ M LHX467 ($n = 5$).

Alle in diesem Protokoll getesteten Liganden führten zu einem initialen Maximum der Emissionsratio gefolgt von einer Abnahme der Emissionsratio bis zum Erreichen eines Plateaus. Die Größe des Maximums unterschied sich signifikant zwischen Daltroban mit $71\% \pm 6\%$ gegenüber Ramatroban mit $20\% \pm 10\%$, LHX445 mit $35\% \pm 5\%$ und LHX447 mit $24\% \pm 3\%$ der durch 3 μ M U46619 hervorgerufenen FRET-Antwort, *Abbildung 6-9A*.

Unter kinetischen Gesichtspunkten wies LHX467 mit $t_{0,5} = 4,4 \text{ s} \pm 0,9 \text{ s}$ gegenüber LHX445 mit $t_{0,5} = 16,2 \text{ s} \pm 4,9 \text{ s}$ und LHX447 mit $t_{0,5} = 20,4 \text{ s} \pm 6,2 \text{ s}$ eine signifikant schnellere Signalabnahme nach Erreichen des Maximums der Emissionsratio auf, so dass sich wesentlich schneller ein Plateau einstellte, *Abbildung 6-9B*.

Die prozentuale Abnahme der Emissionsratio vom Maximum bis zum Plateau normalisiert auf die Antwort von 3 μ M U46619 zeigte für Daltroban mit $85\% \pm 3\%$ und LHX445 mit $86\% \pm 4\%$ gegenüber LHX447 mit $57\% \pm 5\%$ einen signifikanten Unterschied, *Abbildung 6-9C*. Das erreichte Plateau zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Liganden, *Abbildung 6-9D*.

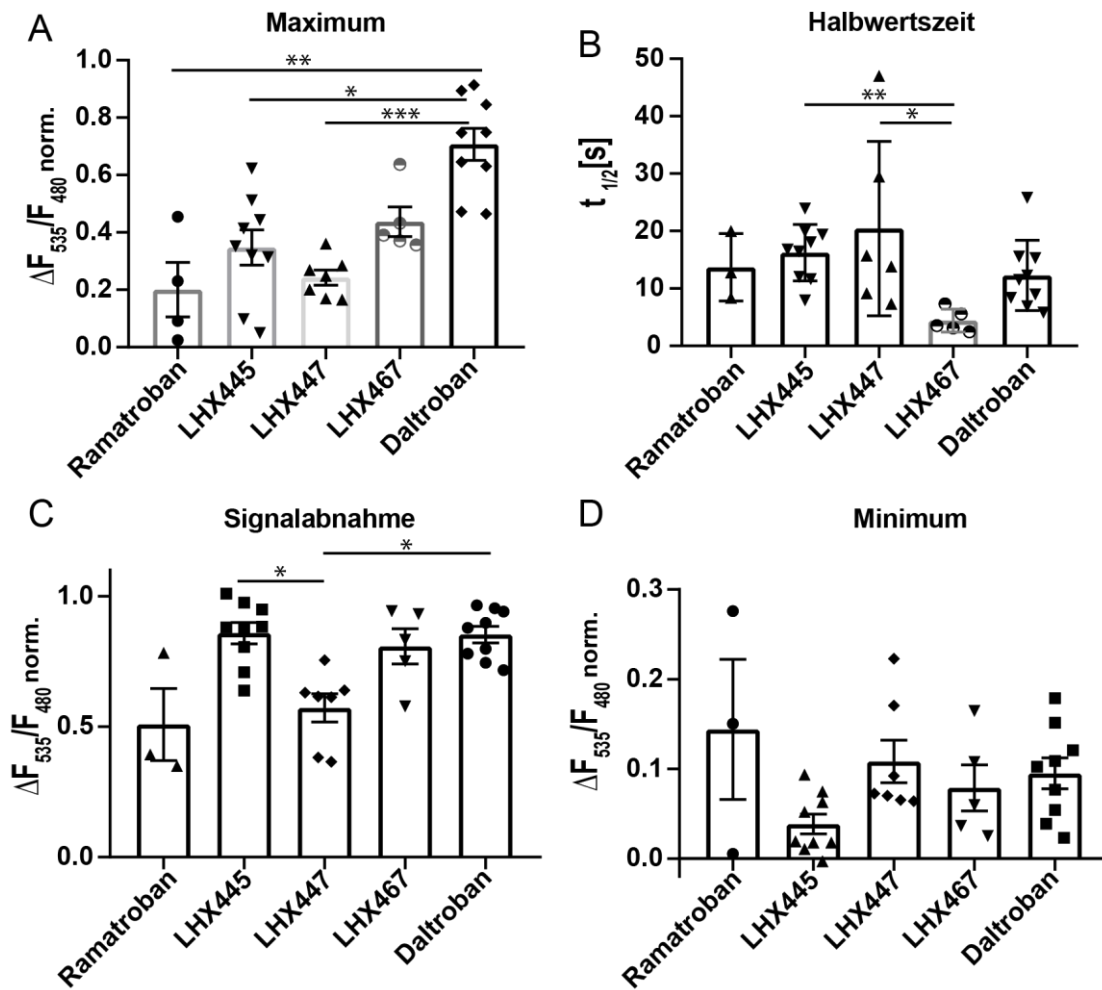


Abbildung 6-9 Vergleich der Wirkung verschiedener Halogenbenzensulfonamide auf den TP-Rezeptor (A) Vergleich der Maxima der verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 20% ± 9%; LHX445 = 35% ± 6%; LHX447 = 24% ± 3%; LHX467 = 44% ± 5%; Daltroban 71% ± 6% *** $p = 0,0003$ Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. angepasster p -Werte: Daltroban:LHX445 * $p = 0,03$; Daltroban:Ramatroban ** $p = 0,005$; Daltroban:LHX447 *** $p = 0,0006$; alle weiteren p -Werte > 0,7; Mittelwerte ± SEM). (B) Vergleich der Halbwertszeiten der verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 13,7 s ± 3,4 s; LHX445 = 16,2 s ± 1,6 s; LHX447 = 20,4 s ± 6,2 s; LHX467 = 4,4 s ± 0,9 s; Daltroban 12,2 s ± 2,0 s ** $p = 0,0073$ Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Angepasste p -Werte: LHX445:LHX467 ** $p = 0,005$; LHX447:LHX467 * $p = 0,02$; alle weiteren p -Werte > 0,25; Mittelwerte ± SEM). (C) Vergleich der Signalabnahme ausgehend vom Maximum der verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 50% ± 14%; LHX445 = 86% ± 4%; LHX447 = 57% ± 5%; LHX467 = 81% ± 7%; Daltroban 85% ± 3% ** $p = 0,005$ Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Angepasste p -Werte: Daltroban:LHX447 * $p = 0,03$; LHX445:LHX447 * $p = 0,02$; alle weiteren p -Werte > 0,2; Mittelwerte ± SEM). (D) Vergleich der Minima zwischen den verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 14% ± 8%; LHX445 = 4% ± 1%; LHX447 = 10% ± 2%; LHX467 = 8% ± 3%; Daltroban 9% ± 2% $p = 0,08$ Kruskal-Wallis Test; Mittelwerte ± SEM).

Mit LHX445 und LHX447 wurden FRET-Messungen multipler Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten, durchgeführt, Abbildung 6-10 links. Bei diesen Messungen konnte keine transiente Konformationsänderung am TP-Rezeptor beobachtet werden. Die induzierte Konformationsänderung lag für LHX445 bei $22\% \pm 1\%$ und für LHX447 bei $21\% \pm 1\%$ - jeweils normalisiert auf die Antwort von $1 \mu\text{M}$ U46619 - und zeigte damit keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Plateau von Daltroban und Ramatroban, Abbildung 6-10 rechts.

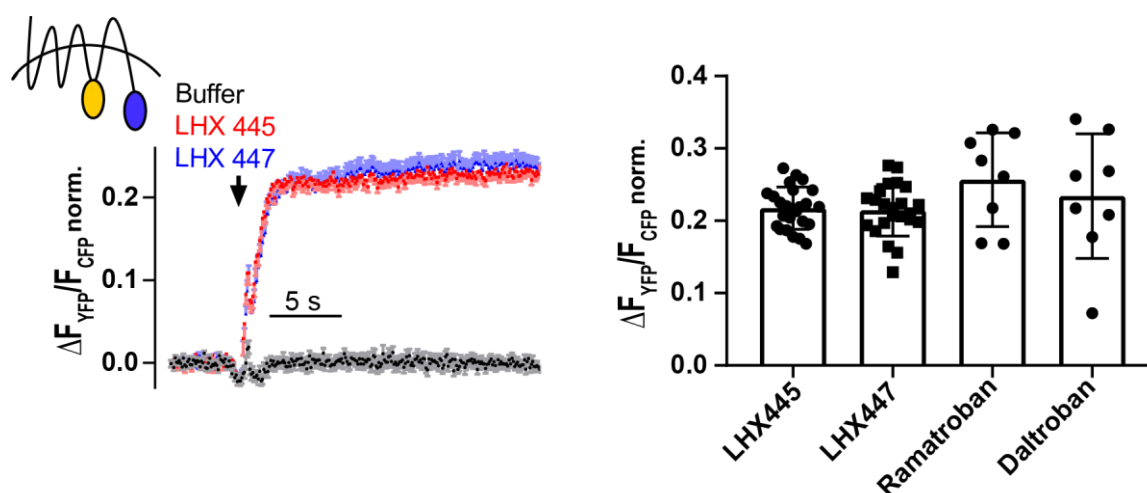


Abbildung 6-10 Keine transiente TP-Rezeptor-Konformationsänderung durch LHX445 und LHX447
 FRET-Messungen multipler Zellen, die den TP-Rezeptor-Sensor stabil exprimierten. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von $1 \mu\text{M}$ U46619 normiert. Links: Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Injektion von Puffer oder der entsprechenden Agonist-haltigen Pufferlösung an. Die resultierende Konzentration von LHX445 und LHX447 in den Wells betrug nach Injektion jeweils $100 \mu\text{M}$. Messungen verschiedener Experimente wurden für jede Gruppe gemittelt und aufgezeichnet. (Mittelwert \pm SEM; Rot: LHX445 $n = 24$; Blau: LHX447, $n = 24$; Schwarz: Puffer, $n = 23$). Rechts: Vergleich Amplitude im Plateau zwischen LHX445 und LHX447, sowie von Ramatroban und Daltroban aus Abbildung 6-4B (LHX445 = $22\% \pm 1\%$; LHX447 = $21\% \pm 1\%$; Ramatroban = $26\% \pm 2\%$; Daltroban $23\% \pm 3\%$; $p = 0,14$ gewöhnliche einfaktorielle Varianzanalyse; Mittelwerte \pm SEM).

6.1.8 TP-Rezeptor-Mutanten mit Wirkung auf den Daltroban Effekt

Der TP-Rezeptor wurde im inaktiven Zustand sowohl mit Daltroban, als auch mit Ramatroban kristallisiert (Fan *et al.*, 2019). Für die Kristallisation wurde die Punktmutation L247^{6.37}A eingefügt, da die resultierende Mutante die besten Eigenschaften bezüglich Proteinausbeute, Homogenität und Thermostabilität aufwies. Wir generierten diese TP-Rezeptor-Mutante. Messungen im durch den TP-Rezeptor induziertem $\text{G}\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay zeigten keine Änderung der Emissionsratio (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf einen Verlust der Fähigkeit des Rezeptors G-Proteine zu aktivieren hin. Daher erfolgte keine weitere Untersuchung dieser Mutante. Weiterhin untersuchten wir unterschiedliche Aminosäuren die eine Interaktion mit Ramatroban und Daltroban aufwiesen. W258^{6.48}, das als Teil eines globalen Kippschaltermechanismus (*Toggle switch*) bei der GPCR-Aktivierung gilt

(Trzaskowski *et al.*, 2012) und Kontakte zu Ramatroban und Daltroban aufwies, wurde zu W258^{6.48}A bzw. W258^{6.48}L (Diese Mutation wurde zuvor in Fan *et al.* durchgeführt (Fan *et al.*, 2019)) mutiert. Beide Mutanten zeigten im $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktions-Assay keine Änderung der Emissionsratio, so dass keine weiteren Untersuchungen möglich waren (Daten nicht gezeigt).

T81^{2.57} wies laut Fan *et al.* potentielle Wasserstoffbrücken mit dem Benzolsulfonamid-Schwanz von Ramatroban und Daltroban auf. Eine vorangegangene Untersuchung in (Fan *et al.*, 2019) zeigte für T81^{2.57}A eine reduzierte Affinität für den TP-Rezeptor-Antagonisten [³H]SQ29548 ohne eine Reduktion der Affinität für den Agonisten U46619. T298^{7.43} wies unpolare Interaktionen mit Ramatroban und polare Interaktionen mit Daltroban auf (Fan *et al.*, 2019). T298^{7.43}A zeigte im $G\alpha_{13}$ -p115 -Interaktions-Assay keine Änderung der Emissionsratio. Sina Kirchhofer schlug an dieser Stelle eine Mutation zu einem Asparagin vor, um so den Abstand zu Ramatroban zu verkürzen und eine polare Interaktion zu ermöglichen. T298^{7.43}N war messbar. Weiterhin wurde W299^{7.44}L untersucht. W299^{7.44}L wurde als Mutante beschrieben an der nur Agonisten, aber keine Antagonisten binden können (Funk *et al.*, 1993; Turek *et al.*, 2002). Diese Mutante wurde in dieser Arbeit bereits in Bezug auf die Spannungsabhängigkeit getestet, *Abbildung 5-9D*.

Die Mutanten an den Positionen T81^{2.57}, T298^{7.43} und W299^{7.44} wurden in dem $G\alpha_{13}$ -p115 Interaktions-Assay untersucht, *Abbildung 6-11A*. Mit TP-Rezeptor-wt und den entsprechenden Mutanten wurden mit Daltroban Konzentrations-Wirkungs-Kurven gemessen, *Abbildung 6-11B*. Da der beobachtete Daltroban Effekt transient war, wurde für die Messung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve jeweils das ermittelte Maximum verwendet. Für TP-Rezeptor-wt ergab sich ein EC₅₀ von 99 nM Daltroban und eine maximale Aktivierung von 70% bezogen auf die Aktivierung durch 3 μ M U46619 *Abbildung 5-9B*. Die Affinität und die maximale Aktivierung waren für die Mutanten T81^{2.57}A (EC₅₀ = 376 nM Daltroban; Maximale Aktivierung: 38%) und T298^{7.43}N (EC₅₀ = 700 nM Daltroban; Maximale Aktivierung: 27%) deutlich gegenüber dem Rezeptor-wt reduziert. Die Affinität und maximale Aktivierung des $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assays war für die TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L überraschenderweise deutlich erhöht (EC₅₀ = 40 nM Daltroban; Maximale Aktivierung: 87%).

Der zeitliche Verlauf der Emissionsratio des $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assays bei Aktivierung der TP-Rezeptor-Mutante T81^{2.57}A, *Abbildung 6-11C* und T298^{7.43}N *Abbildung 6-11D* ähnelten sich und zeigten wie der Rezeptor-wt einen transienten Verlauf.

Der zeitliche Verlauf der Emissionsratio für TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L bei Daltroban Gabe war ebenfalls transient, *Abbildung 6-11E*. Die Signalabnahme war deutlich langsamer als beim Rezeptor-wt. Im folgenden Kapitel wird die weitergehende Untersuchung von der Mutante W299^{7.44}L beschrieben.

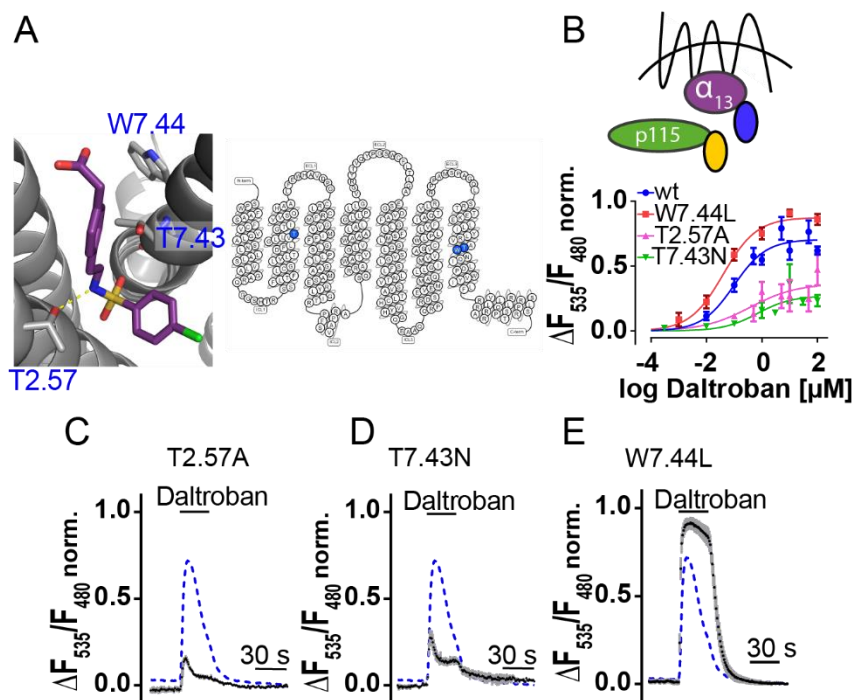


Abbildung 6-11 Daltroban Effekt auf TP-Rezeptor-Mutanten (A) Links: Kristallstruktur des mit Daltroban co-kristallisierten TP-Rezeptors (PDB: 6IIV). Rechts: Snakeplot des TP-Rezeptors, erstellt mit GPCRdb.org, die Positionen mutierter Aminosäuren wurde in blau angezeigt. (B) Daltroban Konzentrations-Wirkungs-Kurven von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt oder einer TP-Rezeptor-Mutante transfiziert wurden. Die durch Daltroban hervorgerufenen Amplituden wurden auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert. TP-Rezeptor-wt ($EC_{50} = 103$ nM, blau); TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L ($EC_{50} = 40$ nM, rot), TP-Rezeptor-Mutante T81^{2.57}A ($EC_{50} = 376$ nM, pink) und TP-Rezeptor T298^{7.43}N ($EC_{50} = 700$ nM, grün); TP-Rezeptor-wt $n = 3-7$; TP-Rezeptor Mutante W299^{7.44}L $n = 3-6$; TP-Rezeptor-Mutante T81^{2.57}A $n = 3-6$; TP-Rezeptor-Mutante T298^{7.43}N $n = 3-4$; Zellen pro Datenpunkt; Mittelwerte \pm SEM. (C)-(E) Die Daltroban Konzentration betrug 100 μ M. Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsratio bei Daltroban Gabe von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die ebenfalls mit dem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und dem TP-Rezeptor-wt transfiziert worden waren, aus Abbildung 6-4A gezeigt. (C) TP-Rezeptor-Mutante T81^{2.57}A ($n = 3$; Mittelwerte \pm SEM) (D) TP-Rezeptor-Mutante T298^{7.43}N ($n = 3$; Mittelwerte \pm SEM) (E) TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L ($n = 7$; Mittelwerte \pm SEM).

6.1.9 Effekt von Daltroban und anderer Halogenbenzulfonamide auf die Aktivität der TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L

Um den Effekt der TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L auf die Aktivierung des TP-Rezeptors durch Daltroban und Analoga eingehender zu untersuchen, erfolgte während den Messungen im $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assay eine Applikation des jeweiligen Liganden für 120 s. Mit diesem Protokoll wurde Daltroban, Ramatroban, LHX445 und LHX447 getestet, Abbildung 6-12A-D. Diese

Messergebnisse stellen, bis auf die Untersuchung von Ramatroban, vorläufige Ergebnisse dar, die in Zukunft wiederholt werden müssen.

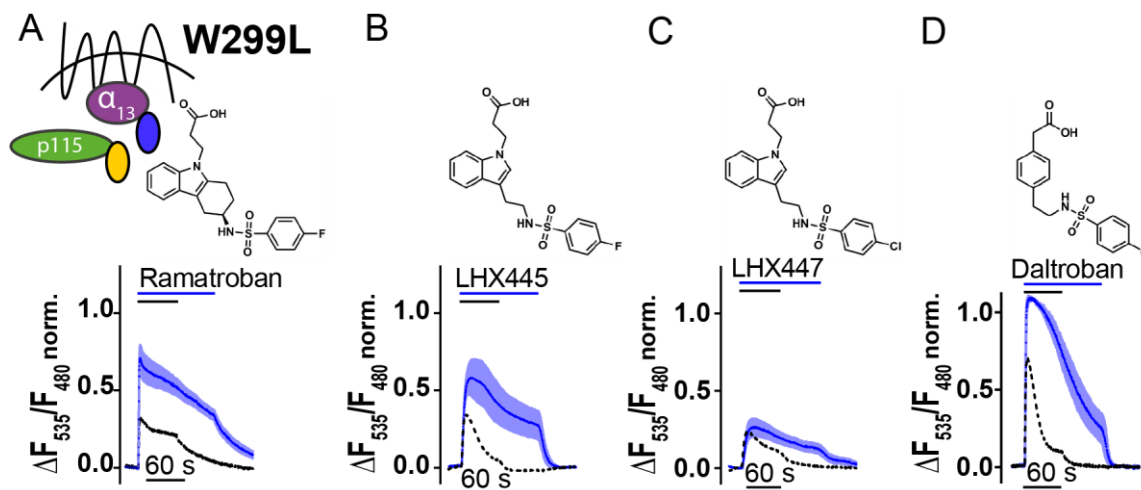


Abbildung 6-12 TP Rezeptor Mutante W299^{7.44}L aktiviert mit Daltroban und Analoga FRET Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G_{\alpha 13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert. Über den Messungen befindet sich jeweils die Strukturformel des untersuchten Liganden. (A) Applikation von 100 μ M Ramatroban ($n = 8$; Mittelwerte \pm SEM). Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsverhältnis von TP-Rezeptor-wt bei Ramatroban Gabe aus Abbildung 6-8A gezeigt. (B) Applikation von 100 μ M LHX445 ($n = 3$; Mittelwerte \pm SEM). Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsverhältnis von TP-Rezeptor-wt bei LHX445-Gabe aus Abbildung 6-8B gezeigt. (C) Applikation von 100 μ M LHX447 ($n = 4$; Mittelwerte \pm SEM). Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsverhältnis von TP-Rezeptor-wt bei LHX447-Gabe aus Abbildung 6-8C gezeigt. (D) Applikation von 100 μ M Daltroban ($n = 3$; Mittelwerte \pm SEM). Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsverhältnis von TP-Rezeptor-wt bei Daltroban Gabe aus Abbildung 6-1A gezeigt.

Alle Liganden führten, wie bereits am TP-Rezeptor-wt beobachtet, zu einem initialen Maximum der Emissionsratio, gefolgt von einer Abnahme der Emissionsratio bis zum Erreichen eines berechneten Plateaus. Das erreichte Maximum unterschied sich signifikant zwischen LHX447 und Daltroban, Abbildung 6-13A. Die Halbwertszeiten und die Signalabnahme in Prozent ausgehend vom Maximum der einzelnen Liganden zeigte für TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L keinen signifikanten Unterschied, Abbildung 6-13B, C. Der nach 120 s erreichte durchschnittliche Wert der normierten Emissionsratio war für Ramatroban signifikant größer als für LHX447, Abbildung 6-13D.

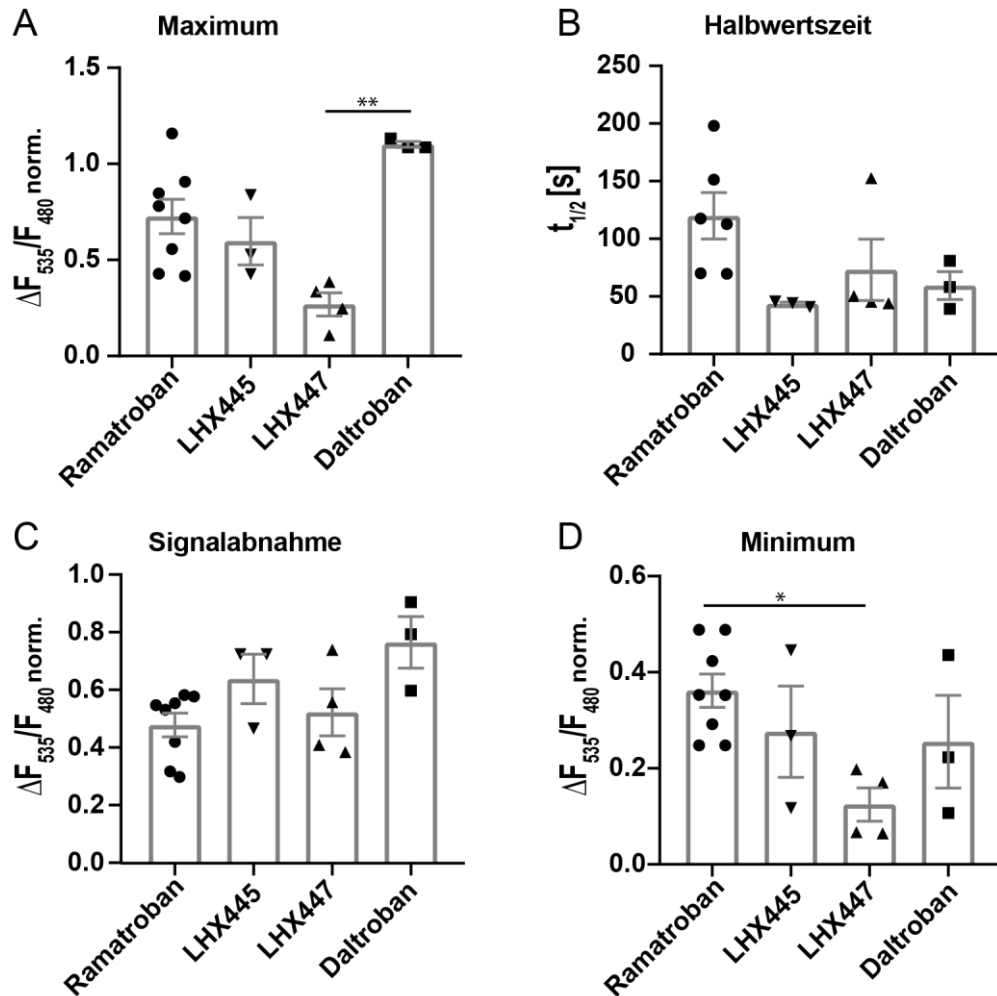


Abbildung 6-13 Vergleich der Wirkung verschiedener Daltroban-Analoga auf die TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L (A) Vergleich der Maxima zwischen TP-Rezeptor-wt und verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 73% \pm 9%; LHX445 = 60% \pm 12%; LHX447 = 27% \pm 6%; Daltroban 110% \pm 2% *** p =0,0007 Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Angepasste p -Werte: Daltroban:LHX447 ** p = 0,006; LHX447:Ramatroban p = 0,06; alle weiteren p -Werte > 0,6; Mittelwerte \pm SEM). (B) Vergleich der Halbwertszeiten der verschiedenen getesteten Liganden (Ramatroban = 120,0 s \pm 20,1 s; LHX445 = 43,7 s \pm 1,4 s; LHX447 = 73,1 s \pm 26,6 s; Daltroban 59,5 s \pm 12,0 s * p = 0,048 Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Angepasste p -Werte: Ramatroban:LHX445 p = 0,08; alle weiteren p -Werte > 0,6; Mittelwerte \pm SEM). (C) Vergleich der Signalabnahme ausgehend vom Maximum zwischen der Ramatroban und Daltroban Applikation (Ramatroban = 48% \pm 4%; LHX445 = 64% \pm 9%; LHX447 = 52% \pm 8%; Daltroban 77% \pm 9% p = 0,05 Kruskal-Wallis Test; Mittelwerte \pm SEM). (D) Vergleich der Minima zwischen der Ramatroban und Daltroban Applikation (Ramatroban = 36% \pm 3%; LHX445 = 28% \pm 10%; LHX447 = 12% \pm 3%; LHX467 = 8% \pm 3%; Daltroban 26% \pm 10% * p = 0,02 Kruskal-Wallis Test; Als Post Hoc Test wurde Dunnetts multipler Vergleichstest verwendet. Angepasste p -Werte: Ramatroban:LHX447 * p = 0,03; alle weiteren p -Werte > 0,7; Mittelwerte \pm SEM).

Die Maxima von Daltroban und Ramatroban waren signifikant größer an der Mutante als am Rezeptor-wt, *Abbildung 6-14A*. Die Maxima von LHX445 und LHX447 zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen Rezeptor-wt und Rezeptor-Mutante, *Abbildung 6-14A*. Die Halbwertszeiten aller getesteten Liganden war signifikant größer an TP-Rezeptor W299^{7.44}L als am TP-Rezeptor-wt, *Abbildung 6-14B*. Die Signalabnahme ausgehend vom Maximum zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Liganden, *Abbildung 6-14C*. Der nach 120 s erreichte durchschnittliche Wert der normierten Emissionsratio war für Ramatroban und LHX445 größer für die Mutante gegenüber Rezeptor-wt, *Abbildung 6-14D*.

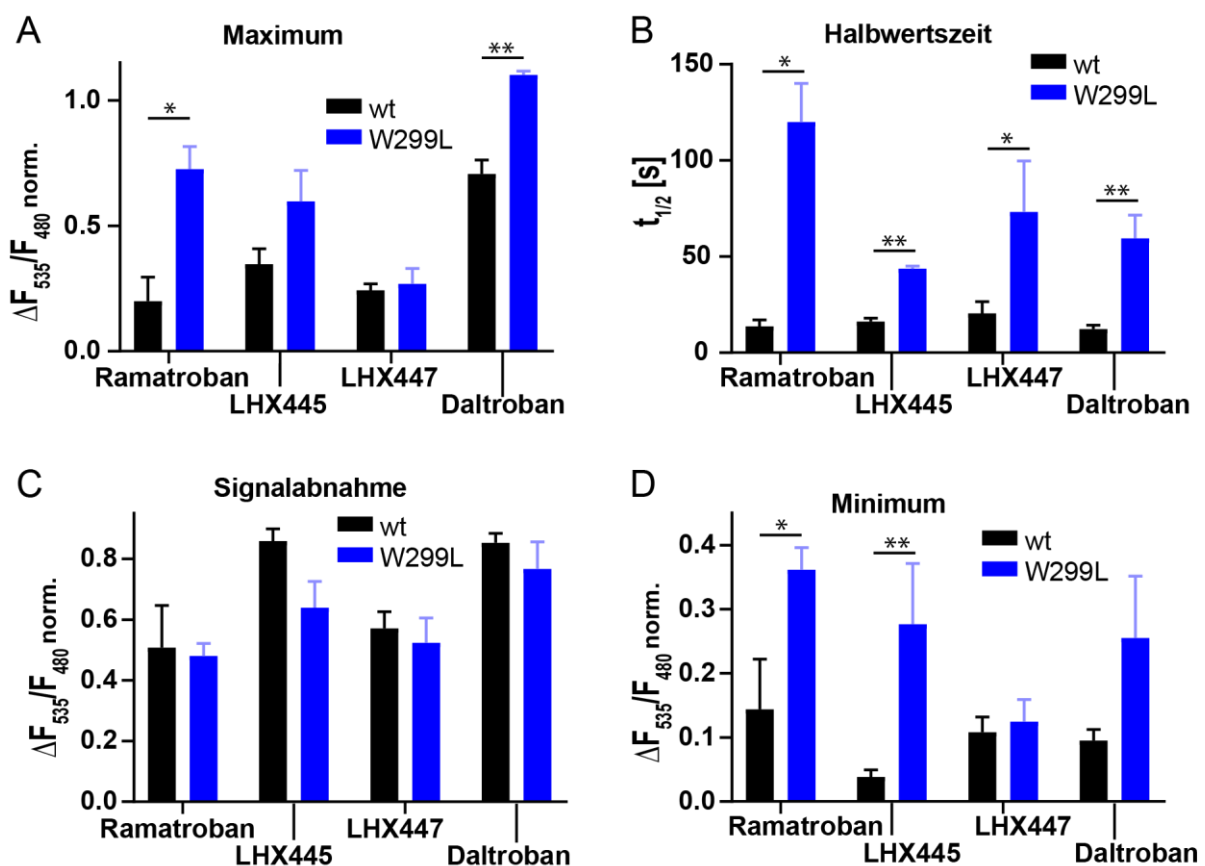


Abbildung 6-14 Unterschiede der Wirkung verschiedener Daltroban-Analoga zwischen TP-Rezeptor-wt und der Mutante W299^{7.44}L (A) Vergleich der Maxima zwischen TP-Rezeptor-wt und TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L aktiviert mit den getesteten Liganden (Ramatroban: * $p = 0,02$; LHX445 $p = 0,1$; LHX447 $p = 0,8$; Daltroban: ** $p = 0,009$; Mann-Whitney Test) (B) Vergleich der Halbwertszeiten der verschiedenen getesteten Liganden zwischen TP-Rezeptor-wt und TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L aktiviert mit den getesteten Liganden (Ramatroban: * $p = 0,02$; LHX445 ** $p = 0,009$; LHX447 * $p = 0,04$; Daltroban: ** $p = 0,009$; Mann-Whitney Test) (C) Vergleich der Signalabnahme ausgehend vom Maximum zwischen TP-Rezeptor-wt und TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L aktiviert mit den getesteten Liganden (Ramatroban: $p > 0,99$; LHX445 $p = 0,1$; LHX447 $p = 0,8$; Daltroban: $p = 0,5$; Mann-Whitney Test) (D) Vergleich der Minima zwischen TP-Rezeptor-wt und TP-Rezeptor-Mutante W299^{7.44}L aktiviert mit den getesteten Liganden

(Ramatroban: * $p = 0,04$ LHX445 ** $p = 0,004$; LHX447 $p > 0,99$; Daltroban: $p = 0,1$; Mann-Whitney Test).

6.1.10 Erhöhte intrinsische Aktivität für Ramatroban an der TP-Rezeptor-Mutante F34^{1.42}A

Die Platzhalterstruktur (Spacer) von Ramatroban zwischen der Carboxylgruppe und der Benzensulfonamidgruppe, nicht aber die von Daltroban, weist eine unpolare Wechselwirkung mit F34^{1.42} auf (Fan *et al.*, 2019), *Abbildung 6-15A*. Wir mutierten F34^{1.42} zu Alanin. Die Mutante verhielt sich im $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assay aktiviert mit U46619 und Daltroban wie Rezeptor-wt, *Abbildung 6-15B*. Interessanterweise wies Ramatroban eine erhöhte intrinsische Aktivität auf, *Abbildung 6-15B* und *Abbildung 6-15C*.

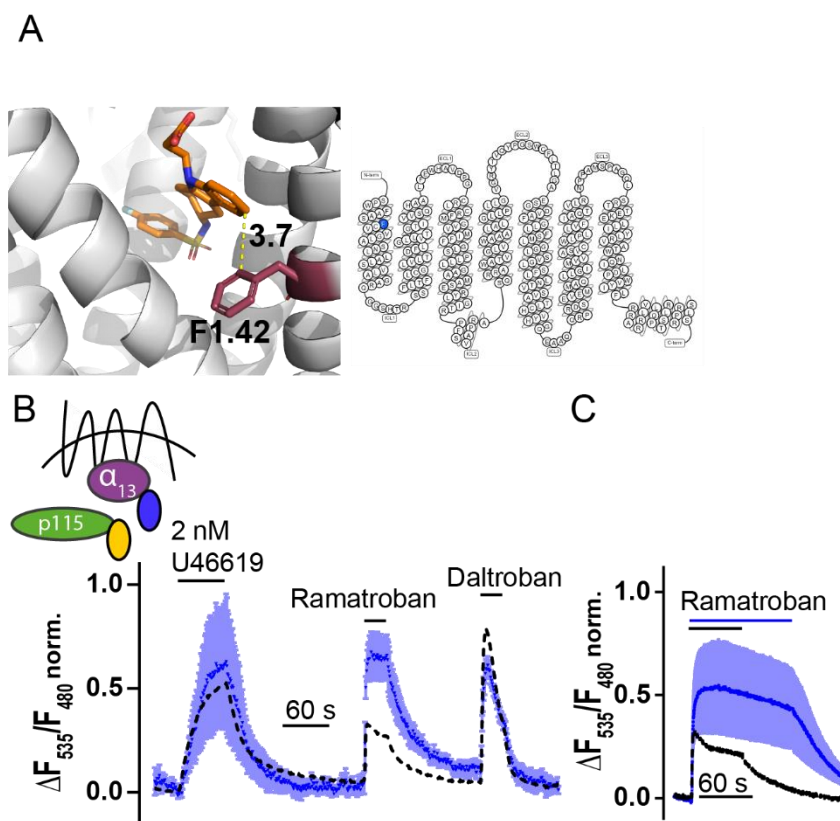


Abbildung 6-15 TP-Rezeptor Mutante F^{1.42}34A zeigt einen verstärkten Ramatroban Effekt (A) Links: Kristallstruktur des mit Ramatroban co-kristallisierten TP-Rezeptors (PDB: 6IIU). Die schwarze Zahl gibt den minimalen Abstand schwerer Atome (in Angström) zwischen Ramatroban und F34^{1.42} an. Rechts: Snakeplot des TP-Rezeptors, erstellt mit GPCRdb.org, die Positionen von F34^{1.42} wurde in blau hervorgehoben. (B) und (C) Mittelwerte \pm SEM in blau von FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-Mutante F34^{1.42} transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert. Zum Vergleich wurde als gestrichelte Linie der Verlauf der aufgezeichneten Emissionsratio bei Ramatroban Gabe von

FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die ebenfalls mit dem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und dem TP-Rezeptor-wt transfiziert worden waren, (B) aus Abbildung 6-4A (C) aus Abbildung 6-8A gezeigt. (B) Ramatroban Applikation für 30 s ($n = 3$) (C) Ramatroban Applikation für 60 s ($n = 3$).

6.1.11 Pinan Thromboxan A_2 zeigt keinen mit Daltroban vergleichbaren transienten Effekt auf die TP-Rezeptor Aktivität

In der Literatur gab es Hinweise auf eine transiente Aktivierung des TP-Rezeptors durch das Thromboxan A_2 -Analogon Pinan Thromboxan A_2 (PTA $_2$) (Armstrong *et al.*, 1985). So wurde eine kleine, transiente Änderung der Form der Thrombozyten beobachtet. PTA $_2$ weist eine Prostanoid-Struktur auf, Abbildung 6-16 oben. In Messungen im durch den TP-Rezeptor induziertem $G\alpha_{13}$ -p115 FRET-Interaktions-Assay zeigte sich PTA $_2$ als Partialagonist ohne einen mit Daltroban vergleichbaren transienten Effekt auf die TP-Rezeptor-Aktivität, Abbildung 6-16 unten.

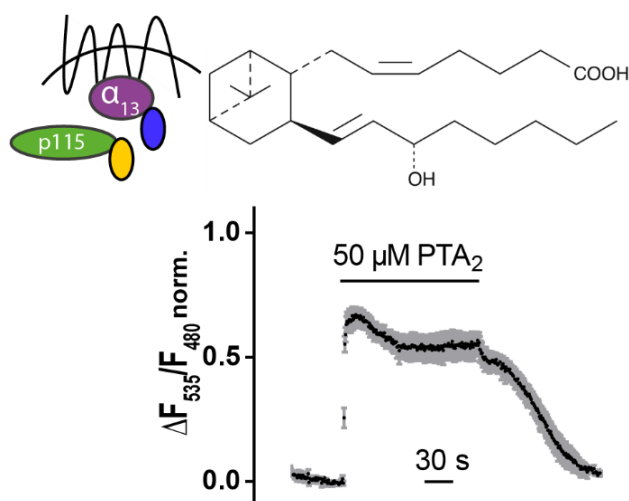


Abbildung 6-16 Effekt von Pinan Thromboxan A_2 auf die TP-Rezeptor Aktivität

Oben: Struktur von Pinan Thromboxan A_2 (PTA $_2$). Unten: FRET-Messungen einzelner HEK293T-Zellen, die mit einem FRET-basierten Biosensor für die $G\alpha_{13}$ -p115-RhoGEF-Interaktion und TP-Rezeptor-wt transfiziert wurden. Die aufgezeichnete Emissionsratio wurde auf die Amplitude einer Referenzkonzentration von 3 μ M U46619 normiert ($n = 4$).

6.2 Diskussion

Im Rahmen der Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors sind wir auf den ursprünglich als TP-Rezeptor-Antagonisten vermarkteten TP-Rezeptor Liganden Daltroban aufmerksam geworden. Unsere Untersuchungen zu Daltroban hat folgende, so noch nicht da gewesene Befunde erbracht:

- a) Daltroban wird in hohen Konzentrationen vom Antagonisten zum Partialagonisten, der den TP-Rezeptor transient aktiviert.
- b) Nach Daltroban-Gabe weist der TP-Rezeptor eine reduzierte Aktivierbarkeit auf.
- c) Für die transiente Aktivierung des TP-Rezeptors ist die spezifische Struktur von Daltroban, sowie dessen Kontakte mit der orthosterischen Bindestelle entscheidend.

Daltroban wird in hohen Konzentrationen vom Antagonisten zum Partialagonisten, der den TP-Rezeptor transient aktiviert.

Wie bereits an verschiedenen Stellen in der Literatur beschrieben (Miki *et al.*, 1992; Bertolino *et al.*, 1995; Valentin *et al.*, 1997), konnten wir zeigen, dass Daltroban kein reiner TP-Rezeptor-Antagonist ist, sondern einen Partialagonismus aufwies. Dieser Partialagonismus zeigte sich allerdings erst bei deutlich höheren Konzentrationen als für den Antagonismus notwendig, *Abbildung 6-5*. Darüber hinaus beobachteten wir allerdings völlig unvorhergesehener Weise in der TP-Rezeptor induzierten Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit p115 eine durch Daltroban hervorgerufene transiente FRET-Interaktion. Es kam zu einem anfänglichen Maximum, das bei ca. 71% (bezogen auf die von 3 μ M U46619 hervorgerufene FRET-Antwort) lag, *Abbildung 6-1B*. Mit einer Halbwertszeit von ca 12 s, *Abbildung 6-1C*, zu einer Abnahme von ca. 85%, *Abbildung 6-1D*, die schließlich zum Erreichen eines Plateaus von ca. 9% führte, *Abbildung 6-1E*. Ein transientes FRET Signal konnte ebenfalls bei der Gabe von Daltroban an der TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_q$ -Aktivierung, *Abbildung 6-3A*, und an den direkten Interaktionen von dem TP-Rezeptor mit $G\alpha_{13}$, *Abbildung 6-3B*, und GRK2, *Abbildung 6-3C*, beobachtet werden. An keiner dieser FRET-Assay konnte eine transiente Interaktion durch Gabe von U46619 beobachtet werden. Weiterhin konnten wir Hinweise sammeln, wonach der beobachteten transienten TP-Rezeptor Signale eine durch Daltroban transiente Konformationsänderung zugrunde lag. So konnte ein Maximum der TP-Rezeptor Konformationsänderung mit anschließender Signalabnahme beobachtet werden, *Abbildung 6-4B*. Die am TP-Rezeptor-Sensor im Anschluss beobachtete Abnahme des Signals bis zum Erreichen eines Plateaus korrelierte zeitlich mit dem durch Daltroban hervorgerufenen Effekt der TP-Rezeptor- $G\alpha_{13}$ -Interaktion, *Abbildung 6-4C*.

Es gibt verschiedene physiologische Regulationen der GPCR vermittelten Signalweiterleitung, hier spielt insbesondere das GRK-Arrestin-System eine Rolle, siehe Abschnitt 3.2.2. So ist es möglich, dass kurze Zeit nach Aktivierung ein durch einen GPCR hervorgerufenen Signal durch Desensibilisierung des

Rezeptors einbricht und das somit gemessene Signal ebenfalls transient ist. Nach meinem Kenntnisstand gibt es jedoch zum jetzigen Zeitpunkt keine Berichte aus der Literatur, die belegen, dass der GPCR selbst in Gegenwart eines Liganden zunächst aktiviert und sich dann wieder abschaltet. Daher ist bereits allein unsere Beobachtung, dass Daltroban zu einer transienten Rezeptor-Aktivierung führt, ein Novum und so bisher völlig unbekannt.

Nach Daltroban-Gabe weist der TP-Rezeptor eine reduzierte Aktivierbarkeit auf.

Nach der Gabe von 100 μM Daltroban konnte, auch nach 120-180 Sekunden langem Ausspülen, nur noch eine verminderte Reaktion auf U46619 an der TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_q$ –Aktivierung, *Abbildung 6-3A*, und an den direkten Interaktionen von dem TP-Rezeptor mit $G\alpha_{13}$, *Abbildung 6-3B*, und GRK2, *Abbildung 6-3C*, beobachtet werden. Dies war ebenfalls am TP-Rezeptor-Sensor der Fall, *Abbildung 6-6A*. Um mehr über den Zeitverlauf dieser reduzierten Rezeptorfunktion zu erfahren, wurde nach der 30 Sekunden langen Gabe von U46619 erneut für 120 s ausgespült und im Anschluss erneut U46619 appliziert, gefolgt von weiteren 120 s Puffer und einer erneuten Daltroban Applikation. Auch in diesem deutlich verlängerten Protokoll kam es zu keiner signifikanten Wiederherstellung der ursprünglichen Sensitivität auf U46619, *Abbildung 6-3B*. Die Restaktivierbarkeit lag bei allen Assay zwischen ca. 20 und 40% des ursprünglich möglichen Signals. Darüber hinaus wären FRET Experimente von Interesse, die den Zeitraum weiter festlegen, in denen der Post-Daltroban Effekt anhält. Auch eine wesentlich niedrigere Konzentration von 3 μM Daltroban, die keinen Partialagonismus auf Sensor-Ebene aufwies, sondern nur antagonistisch wirkte, *Abbildung 6-5*, führte im Zeitraum von 120 s zu keiner Erholung des U46619 Effektes auf U46619 am TP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 6-6B*.

Auf Grundlage unserer Experimente gibt es zwei mögliche Erklärungen für die beobachtete verringerte Antwort des TP-Rezeptors auf U46619 Gabe: Entweder bindet Daltroban mit sehr hoher Affinität an den Rezeptor, so dass in dem von unseren Messungen abgedeckten Zeitraum nur eine vernachlässigbare Menge Daltroban den Rezeptor verlässt und die Bindestelle für U46619 schlicht besetzt ist oder aber Daltroban bindet am TP-Rezeptor und modifiziert diesen nachhaltig für einen unbestimmten Zeitraum, auch nachdem Daltroban bereits den Rezeptor wieder verlassen hat. In der Literatur gibt es sowohl Berichte über kompetitive, als auch über eine nicht-kompetitive Hemmung des TP-Rezeptors durch Daltroban, die durchgeführten Messungen erfolgten auf funktioneller Ebene (John *et al.*, 1998).

Bestimmte Liganden können den $\beta_1\text{AR}$ in eine Konformation überführen, die eine verringerte Affinität für β -Blocker aufweist. Man spricht von einer „sekundären Konformation“, die durch „nicht-konventionelle Partialagonisten“ herbeigeführt wird (Pak and Fishman, 1996; Kaumann and Molenaar, 2008). Zu diesen Liganden zählen z.B. Pindolol und CGP12177, die, wie bei Daltroban beobachtet, in niedriger Konzentration einen Antagonismus aufwiesen und in hohen Konzentrationen zum Partialagonisten wurden. Bei CGP12177 war dieser beobachtete Effekt ausgeprägter (Kaumann and

Molenaar, 2008). Für diese nicht-konventionelle Partialagonisten zeigten die Konzentrations-Wirkungs-Kurven einen biphasischen Verlauf (Baker *et al.*, 2014). Dies haben wir bisher noch nicht für Daltroban am TP-Rezeptor beobachtet. Weiterhin konnte der durch CGP12177 herbeigeführte Agonismus nur durch sehr hohe Konzentrationen β -Blocker antagonisiert werden (Kaumann and Molenaar, 2008), hier besteht möglicherweise eine Parallele zur reduzierten U46619 Antwort nach Daltroban-Gabe. Meines Wissens nach ist nicht bekannt, ob die Rezeptorkonformation des β 1AR bei Applikation von CGP12177 eine transiente Änderung zeigt, da bisher noch keine Echtzeit-Messungen durchgeführt wurden. Um zu ergründen, ob es sich hierbei möglicherweise um einen vergleichbaren Mechanismus handelt, wäre es daher von Interesse solche Echtzeit-Messungen z.B. mittels FRET am β 1AR durchzuführen. Interessant ist auch, dass CGP12177 am β 2AR keine sekundäre Konformation herbeiführte (Pak and Fishman, 1996). Daher wäre es von Interesse Daltroban auch am nah verwandten FP-Rezeptor zu testen. Sollten Unterschiede auftreten, könnten im Verlauf der weiteren Untersuchung gezielte Rezeptorabschnitte ausgetauscht werden (Bildung von Rezeptor-Chimären zwischen TP- und FP-Rezeptor) und diese Mutanten entsprechend bzgl. der Daltroban-Wirkung untersucht werden.

Darüber hinaus gibt es Evidenz für eine zweite zumindest in Teilen abweichende Bindestelle für Daltroban als Partialagonist gegenüber Daltroban als Antagonist. So konnte nach der nahezu vollständigen Besetzung der TP-Rezeptoren mit Daltroban mit einem rein antagonistischen Effekt ein partialagonistischer Effekt mit einer um Faktor 100 erhöhten Daltroban Konzentration hervorgerufen werden, *Abbildung 6-5*.

Die Affinität von Daltroban wurde in vorangegangenen Arbeiten bestimmt. In Radioliganden-Verdrängungs-Studien mit [3 H]SQ29,548 wurde ein K_i von Daltroban von ca. 2 bzw. 20 nM in Ratten VSMC bestimmt (Miki *et al.*, 1992) (Mittelwerte \pm SEM). Der K_i von SQ29,548 betrug ca. 2 nM und der von U46619 ca. 14 bzw. ca. 410 nM. In einer anderen Arbeit wurden die K_i von Daltroban (ca. 28 nM) und Ramatroban (ca. 175 nM) in Radioliganden-Verdrängungs-Studien mit [3 H]SQ29,548 in transfizierten Sf9-Zellen ermittelt (Fan *et al.*, 2019). Die Affinität von Daltroban war somit deutlich größer als die von U46619. Möglicherweise wäre es daher interessant, die FRET-Messungen zur Auswaschbarkeit des Daltroban Effektes, *Abbildung 6-6*, mit SQ29,548 zu wiederholen, da dieses mindestens so affin für den TP-Rezeptor ist wie Daltroban, aber keinen bekannten agonistischen Effekt aufweist.

Wir konnten beobachten, dass von Daltroban hervorgerufene agonistische Effekte an dem TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay, *Abbildung 6-1A*, und am TP-Rezeptor-Sensor, *Abbildung 6-6*, ausgewaschen werden konnten. Da aber unklar ist, ob und wie der Antagonismus und der Partialagonismus von Daltroban verknüpft sind, wäre es von Nutzen direkt die Anwesenheit des Agonisten am TP Rezeptor zu untersuchen.

Für eine solche Untersuchung gibt es die Möglichkeit einen Liganden zu markieren. Dies wäre mit einem Fluorophor oder mittels eines radioaktiven Isotopes möglich. Da Daltroban sehr klein ist und die Konjunktion mit einem Fluorophor eine zu große Modifikation darstellen würde, könnten Experimente mit einem radioaktiven Daltroban hier in zukünftigen Experimenten Aufschluss geben. So könnte getestet werden, ob und in welchem Zeitraum Daltroban tatsächlich den Rezeptor verlässt.

Für die transiente Aktivierung des TP-Rezeptors ist die spezifische Struktur von Daltroban, sowie dessen Kontakte an der orthosterischen Bindestelle entscheidend.

Der für Daltroban beobachtete transiente Effekt war in seiner Erscheinung keine für alle Halogenbenzulfonamide zu beobachtendes Phänomen. So zeigte sich im TP-Rezeptor induzierten $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay in Zellen die jeweils nacheinander mit beiden Liganden getestet wurden, dass das Halogenbenzulfonamid Ramatroban ein signifikant kleineres Maximum gegenüber Daltroban aufwies und die Signalabnahme nur einen Bruchteil von dem bei Daltroban beobachtetem aufwies. Ramatroban unterscheidet sich von Daltroban durch eine starrere Struktur, so besteht der Linker zwischen Carboxylgruppe und Benzolsulfonamid eine Ringstruktur auf. Dieser Ring wurde bei LHX445 geöffnet. LHX445 wies eine Signalabnahme ausgehend vom Maximum von ca. 86%, die vorläufigen Ergebnisse für Ramatroban ergaben ca. 50%. Der Unterschied war nicht signifikant, deutet aber zumindest einen Trend an. Wurde das Halogen von LHX445 für die Synthese von LHX447 von Fluor zu Chlor substituiert und somit Daltroban ähnlicher gemacht, so ging dieser Effekt verloren (Signalabnahme LHX447 ca. 57%). Für die Synthese von LHX467 wurde Chlor zu Fluor substituiert. Vorläufige Daten weisen darauf hin, dass die Geschwindigkeit der Signalabnahme dieses Liganden wesentlich schneller abläuft, als die der übrigen getesteten Liganden (Angaben ca.: 14 s für Ramatroban; 16 s für LHX445; 20 s für LHX447; 4 s für LHX467; 12 s für Daltroban). An diesen Befunden ist insbesondere erstaunlich, dass die Unterschiede der chemisch ähnlichen Halogene Fluor und Chlor für die Aktivierung und anschließende Deaktivierung des TP-Rezeptors von Bedeutung zu sein scheinen.

Daltroban, Ramatroban, LHX445 und LHX447 wurden am TP-Rezeptor-Sensor in *Wells* gemessen. Lediglich für Daltroban konnte ein transienter Effekt am Sensor beobachtet werden. Die Amplitude des transienten Effektes war an der Auflösungsgrenze des Assay und Daltroban wies von allen am TP Sensor getesteten Liganden das größte Maximum am $G\alpha_{13}$ -p115-Interaktions-Assay auf, was eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung darstellt. Die hervorgerufenen Amplituden im Plateau wiesen für alle getesteten Liganden keine signifikanten Unterschiede auf.

Durch die Mutation W299^{7.44}L erhöhte sich die intrinsische Aktivität und die Kinetik der Signalabnahme reduzierte sich für alle getesteten Liganden. Dieser erstaunliche Effekt von W299^{7.44}L ist schwer zu erklären. W299^{7.44}L wurde als Mutante beschrieben an der nur Agonisten, aber keine Antagonisten binden können (Funk *et al.*, 1993; Turek *et al.*, 2002). Laut der Kristallstruktur weist W299^{7.44} keine direkte Interaktion mit Daltroban auf (Fan *et al.*, 2019).

TP-Rezeptor Mutanten T81^{2,57}A und T298^{7,43}N, die entsprechend der Kristallstruktur von TP-Rezeptor, co-kristallisiert mit Daltroban im inaktiven Zustand, jeweils eine Auswirkung auf einen Kontakt zwischen Ligand und Rezeptor aufwiesen, führten zu einem Effekt auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Daltroban, was darauf hindeutet, dass die Kontakte für Daltroban zum Rezeptor für eine Funktion als Agonist und als Antagonist zumindest teilweise überlappen.

Um den transienten Effekt am TP-Rezeptor insbesondere durch Daltroban eingehender zu untersuchen, wären MD-Simulationen von Interesse. Diese könnten möglicherweise klären, ob dem transienten Effekt ein Wechsel der Bindeposition von Daltroban zugrunde liegt. Sollte es möglich sein, eine solche alternative Bindestelle *in silico* zu identifizieren, könnten möglicherweise Punktmutationen an vorausgesagten Bindestellen mit anschließenden FRET-Experimenten Klarheit bringen.

7 Systematische Erstellung FRET-basierter GPCR-Rezeptor-Sensoren

7.1 Ergebnisse

GPCR-Konformationssensoren erleichtern stark die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit von GPCRs, da sie direkt die Rezeptoraktivität widerspiegeln und eine Untersuchung der Qualität und Quantität des Spannungseffektes auf die GPCR-Aktivität ermöglichen. Aus diesem Grund wurde in dieser Untersuchung eine schematische Herangehensweise zur Klonierung von Rezeptor-Sensoren entwickelt. So wurde die Auswärtsbewegung der GPCRs bei Aktivierung genutzt, indem die Fluorophore in ICL3 und in den C-Terminus inseriert wurden. eYFP wurde immer in die ICL3 inseriert, da es Hinweise gab, dass dies weniger störend für die Rezeptorlokalisation war (Krasel and Hoffmann, 2010), mTurquoise2 wurde folglich in den C-Terminus eingefügt bzw. an den C-Terminus angehängt. Die Positionen wurden hierbei analog der erfolgreichen Klonierung des TP-Rezeptor-Sensors in Abschnitt 5.1.1.1 gewählt. Nach diesem Schema erfolgten Arbeiten zur Klonierung von FRET-basierten Rezeptor-Sensoren für IP-Rezeptor, EP₃-Rezeptor, FP-Rezeptor und ET_B-Rezeptor. Für die nachfolgend beschriebenen Klonierungen wurde der Erfolg jeweils durch Sequenzierung sichergestellt.

7.1.1 Klonierung eines IP-Rezeptor-Sensors

Für die Generierung eines IP-Rezeptor-Sensors wurde zunächst ein von cDNA.org gekaufter ungelabelter IP-Rezeptor, C-terminal mittels geeigneter Schnittstellen mit einem mTurquoise2 gelabelt. Zwischen G222 und S223 (gelb hervorgehoben in *Abbildung 7-1A*) wurden über eine Mutagenese PCR eine KpnI und eine EcoRI Schnittstelle eingefügt. Mittels der eingefügten Schnittstellen wurde zwischen G222 und S223 ein eYFP eingefügt. Die Schnittstellen dienten zusätzlich als kleine Linker. Das so erstellte Konstrukt wies nur eine sehr schlechte Membranlokalisation auf und die wenigen Zellen, die gemessen werden konnten, zeigten keine vom Rauschen unterscheidbaren Signale (Daten nicht gezeigt). Analog wurde in IP-mTurquoise2 zwischen G225 und P226 ein eYFP mit den gleichen Schnittstellen eingefügt. Dieses Konstrukt wurde überhaupt nicht exprimiert (Bilder nicht gezeigt).

Eine Besonderheit des IP-Rezeptors ist, dass er C-Terminus über eine CAAX Sequenz verfügt, die postranslational isoprenyliert wird (Hayes *et al.*, 1999). Dies ist für GPCRs sehr außergewöhnlich. Dieses Motiv wurde beim vorangegangenen Versuch durch Einfügen des Fluorophors an dieser Stelle maskiert. Um diese CAAX Sequenz intakt zu lassen, wurde im weiteren Versuch das mTurquoise2 in den distalen C-Terminus inseriert und nicht wie sonst üblich angehängt. Spezifisch wurde mittels *Gibson Assembly* mTurquoise2 in den C-Terminus des IP-Rezeptors zwischen A327 und S328 (blau hervorgehoben in *Abbildung 7-1A*) flankiert von AgeI und EcoRV inseriert. Als Orientierung für die Position diente der Abstand des TP-Rezeptors zwischen H8 und Ende des C-Terminus. Ebenfalls mittels *Gibson Assembly* wurde anschließend zwischen G222 und S223 eYFP flankiert von NotI und SacII eingefügt (gelb hervorgehoben in *Abbildung 7-1A*).

HEK293-Zellen wurden mit Effectene® mit dem IP-Rezeptor-Sensor transfiziert. Es wurden stabile Zelllinien mit dem IP-Rezeptor-Sensor Konstrukt generiert. Ein Klon zeigte eine für Messungen geeignete Expression und Membranlokalisation und konnte daher für weitere Messungen verwendet werden, *Abbildung 7-1B*.

FRET-Experimente mit dem IP-Rezeptor-Sensor zeigten bei Stimulation mit dem stabilen Analogon des endogenen Liganden PGI₂, Iloprost eine Liganden-induzierte Zunahme der CFP Emission und simultaner Abnahme der YFP Emission *Abbildung 7-1C*. Die beobachtete Abnahme der Emissionsratio bei Rezeptoraktivierung ähnelte der am TP-Rezeptor-Sensor beobachteten, *Abbildung 5-3*.

Die Applikation einer sättigenden Konzentration von Iloprost führte zu einer maximalen Änderung der Emissionsratio von $3,3\% \pm 0,2\%$, ausgehend von der Basislinie. Die Änderungen der Emissionsratio war nach Wegnahme des Agonisten reversibel, *Abbildung 7-1C*.

Die Liganden-induzierte Änderung der Emissionsratio war konzentrationsabhängig. Für IP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Der EC₅₀ lag bei 90 nM, *Abbildung 7-1D*.

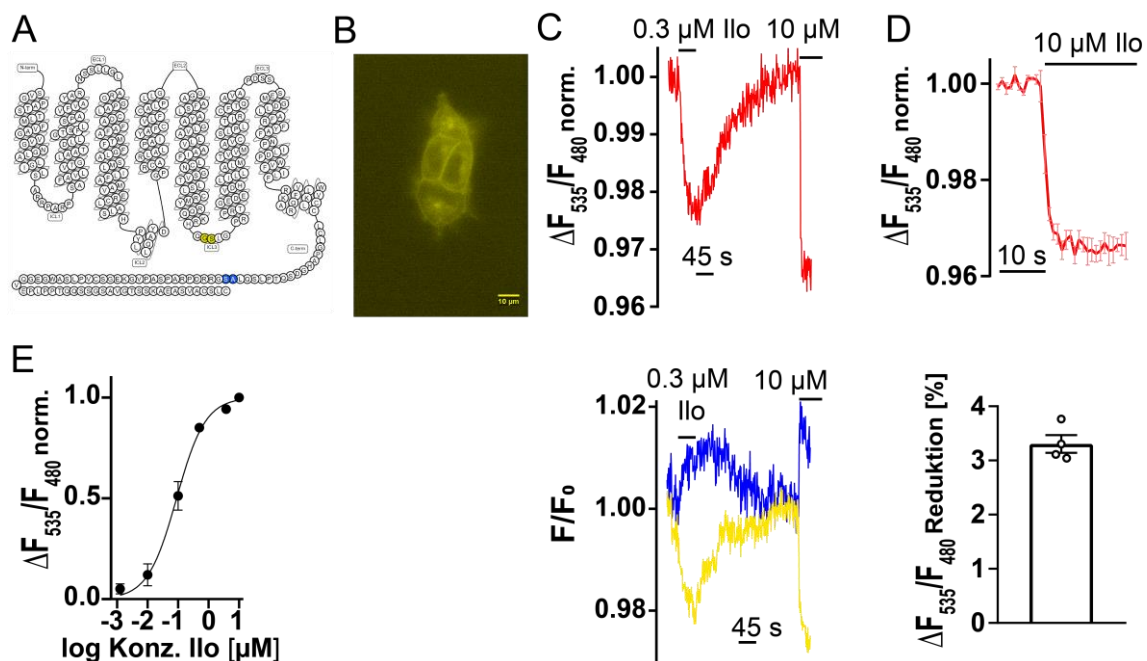


Abbildung 7-1 Klonierung eines IP-Rezeptor-Sensors (A) Ein Snakeplot des IP-Rezeptors wurde mit Hilfe von GPCRdb.org erstellt. Für die Klonierung eines FRET-basierten Konformations-Sensors wurde eYFP zwischen G222 und S223 (gelb) in ICL3 unterhalb von TM5 eingefügt. Die Markierung mit mTurquoise2 erfolgte am C-Terminus zwischen A327 und S328. (B) Zu sehen sind mikroskopische Bilder des ausgewählten Klon der HEK293-Zellen mit stabiler Expression des IP-Rezeptor-Sensors. (C) Die Emission von CFP und YFP einer Einzelzelle, die den IP-Rezeptor-Sensor stabil exprimiert, wurden aufgezeichnet. Es wurden 0,3 µM und 10 µM Iloprost appliziert und das auftretende

Photobleichen korrigiert. Oben wurde die Emissionsratio YFP / CFP in rot dargestellt (auf Anfangswerte normiert). Unten wurden die Einzelkanal-Fluoreszenzen in den entsprechenden Farben dargestellt. Es handelt sich um eine repräsentative Messung von $n = 4$. (D) Oben: Mittelwerte \pm SEM von Messungen zu den in (C) oben gezeigtem Protokoll (Ausschnitt, $n = 4$). Unten: Prozentuale Änderung der Emissionsratio des IP-Rezeptor-Sensors ausgehend von der Basislinie ($3,3 \% \pm 0,3 \%$). (E) Konzentrations-Wirkungs-Kurve für HEK293-Zellen, die stabil den IP-Rezeptor-Sensor exprimierten, ($EC_{50} = 90 \text{ nM}$), die Messungen erfolgten, ähnlich zu den in (C) gezeigten, normalisiert wurde auf die durch $10 \mu\text{M}$ Iloprost hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle. Dargestellt wurden Mittelwerte \pm SEM für die getesteten Konzentrationen ($n = 4$ pro Datenpunkt).

7.1.2 Begonnene Klonierung eines EP₃-Rezeptor-Sensors

Für die Klonierung eines EP₃-Rezeptor-Sensors diente als Ausgangsplasmid der ungelabelte EP₃-Rezeptor, synthetisiert von Eurofins (Eurofins Genomics). Ausgehend vom Abstand des TP-Rezeptors zwischen Beginn der H8 und dem Ende des C-Terminus wurde der C-Terminus des EP₃-Rezeptors nach S379 abgeschnitten (hervorgehoben in blau *Abbildung 7-2A*) und dahinter mTurquoise2 flankiert von AgeI und EcoRV mittels *Gibson Assembly* eingefügt. Das resultierende EP₃-Rezeptor-mTurquoise2 Konstrukt wies bei transienter Transfektion eine gute Membranlokalisation und Expression auf, *Abbildung 7-2B*. Ein anschließendes Einfügen eines eYFP zwischen S267 und Q268 (hervorgehoben in gelb, *Abbildung 7-2A*) in ICL3 war bisher noch nicht erfolgreich und sollte zukünftig erfolgen.

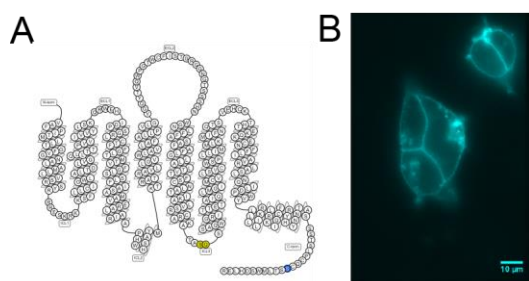


Abbildung 7-2 Plan für die Klonierung eines EP₃-Rezeptor-Sensors (A) Ein Snakeplot des EP₃-Rezeptors wurde mit Hilfe von GPCRdb.org erstellt. Die geplante Insertionsstelle für eYFP zwischen S267 und Q268 in ICL3 unterhalb von TM5 wurde in gelb hervorgehoben. Der C-Terminus wurde nach S379 (blau) abgeschnitten, die Markierung mit mTurquoise2 erfolgte am verkürzten C-Terminus (B) Mikroskopische Bilder von

HEK293T-Zellen, die transient EP₃-Rezeptor-mTurquoise2 exprimierten.

7.1.3 Klonierung eines FP-Rezeptor-Sensors

Für die Klonierung des FP-Rezeptor-Sensors diente als Ausgangsplasmid der ungelabelte FP-Rezeptor von cDNA.org. Ausgehend vom Abstand des TP-Rezeptors zwischen Beginn der H8 und dem Ende des C-Terminus wurde der C-Terminus des FP-Rezeptors nach K339 abgeschnitten (hervorgehoben in blau, *Abbildung 7-3A*) und dahinter mTurquoise2 flankiert von AgeI und EcoRV mittels *Gibson Assembly* eingefügt. Als Nächstes wurde eYFP in die ICL3 flankiert von NotI und SacII zwischen Q239 und G240 (hervorgehoben in gelb, *Abbildung 7-3A*) eingefügt. Im Anschluss wurde das Konstrukt transfiziert und eine stabile HEK293-Zelllinie generiert. Ein Klon wies die erforderlichen Eigenschaften

Membranlokalisation und ausreichende Expression auf, so dass er für weitere Messungen zur Verfügung stand, *Abbildung 7-3B*. Zu unserer Überraschung zeigte sich Agonist-induziert eine Zunahme des FRET, *Abbildung 7-3C* oben.

So nahm bei U46619 Gabe die CFP Emission ab und simultan die YFP Emission zu, *Abbildung 7-3C* unten.

Eine solche Zunahme im FRET konnte auch bereits für einen M1ACh-Rezeptor-Sensor beobachtet werden, der analog zu unserem FP-Rezeptor-Sensor aufgebaut war (Jensen *et al.*, 2009), als auch für FIASH-basierte M1ACh-, M3ACh- und M5ACh-Rezeptor-Sensoren (Ziegler *et al.*, 2011). Es ist davon auszugehen, dass es die FRET-Änderung durch Rezeptor-Aktivierung induzierte Konformationsänderung widerspiegelt und diese sich trotz der unterschiedlichen Richtung der FRET Änderung nicht wesentlich von der anderer GPCRs unterscheidet, siehe Diskussion 7.2.

Die Agonist-induzierte Änderung der Emissionsratio betrug $4,2\% \pm 0,6\%$, *Abbildung 7-3D*, ausgehend von der Basislinie, und war konzentrationsabhängig. Für FP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Der EC_{50} lag bei 249 nM, *Abbildung 7-3E*.

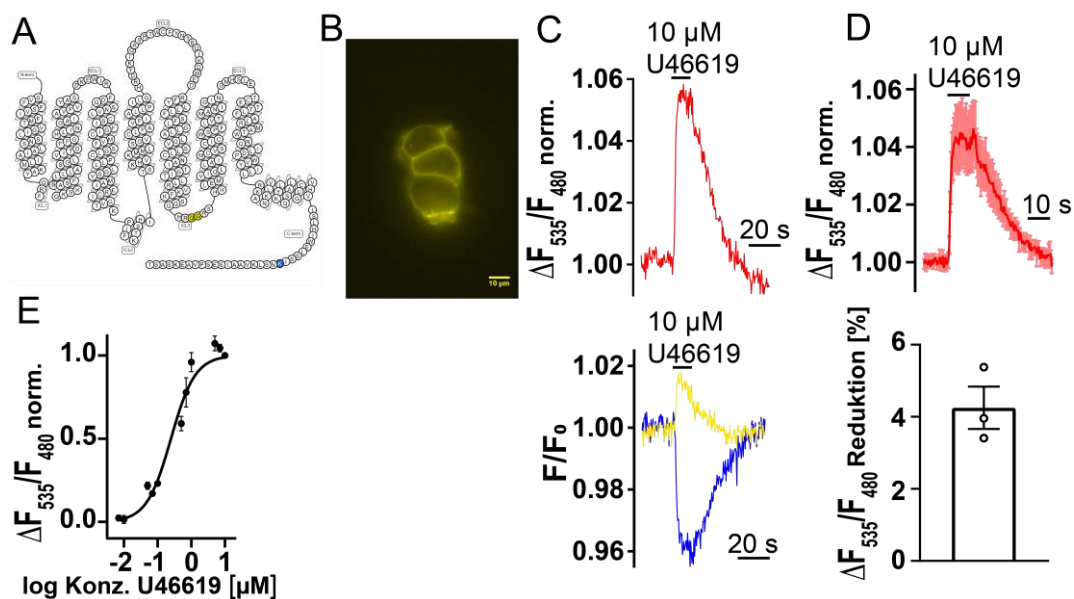


Abbildung 7-3 Klonierung eines FP-Rezeptor-Sensors (A) Ein Snakeplot des FP-Rezeptors wurde mit Hilfe von GPCRdb.org erstellt. Für die Klonierung eines FRET-basierten Konformations-Sensors wurde eYFP zwischen Q239 und G240 (gelb) in ICL3 unterhalb von TM5 eingefügt. Der C-Terminus wurde nach K339 abgeschnitten und die Markierung mit mTurquoise2 erfolgte am verkürzten C-Terminus. (B) Zu sehen sind mikroskopische Bilder des ausgewählten Klon der HEK293-Zellen mit stabiler Expression des FP-Rezeptor-Sensors. (C) Die Emission von CFP und YFP einer Einzelzelle, die den FP-Rezeptor-Sensor transient exprimiert, wurden aufgezeichnet. Es wurden 10 µM U46619 appliziert und das auftretende Photobleichen korrigiert. Oben wurde die Emissionsratio YFP / CFP in rot dargestellt (auf Anfangswerte normiert). Unten wurden die Einzelkanal-Fluoreszenzen in den

entsprechenden Farben dargestellt. Es handelt sich um eine repräsentative Messung (von $n = 3$). (D) Oben: Mittelwerte \pm SEM von Messungen zu den in (C) oben gezeigtem Protokoll ($n = 3$). Unten: Prozentuale Änderung der Emissionsratio des FP-Rezeptor-Sensors ausgehend von der Basislinie ($4,2 \% \pm 0,6 \%$). (E) Dargestellt ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für HEK293T-Zellen, die den FP-Rezeptor-Sensor transient exprimierten ($EC_{50} = 249 \text{ nM}$). Normalisiert wurde auf die durch $10 \mu\text{M}$ U46619 hervorgerufene Änderung der Emissionsratio in der jeweiligen Zelle. Dargestellt wurden Mittelwerte \pm SEM für die getesteten Konzentrationen ($n = 3 - 6$ pro Datenpunkt).

7.1.4 Klonierung eines ET_B-Rezeptor-Sensors

Für die Klonierung des ET_B-Rezeptor-Sensors diente als Ausgangsplasmid der ungelabelte ET_B-Rezeptor, der uns freundlicherweise von Prof. Dr. Michael Schäfer aus Leipzig zur Verfügung gestellt wurde. Ausgehend vom Abstand des TP-Rezeptors zwischen Beginn der H8 und dem Ende des C-Terminus wurde der C-Terminus des ET_B-Rezeptors nach L421 abgeschnitten (hervorgehoben in blau, *Abbildung 7-4A*) und dahinter mTurquoise2 mittels *Gibson Assembly* eingefügt. Als Nächstes wurde eYFP in die ICL3 flankiert von NotI und SacII zwischen I309 und S310 (hervorgehoben in gelb, *Abbildung 7-4A*) eingefügt. Im Anschluss wurde das Konstrukt transfiziert und eine stabile HEK293-Zelllinie von Alwina Bittner generiert. Zwei Klone wiesen die erforderlichen Eigenschaften Membranlokalisation und ausreichende Expression auf, so dass er für weitere Messungen zur Verfügung stand, *Abbildung 7-4B*.

Bei Applikation von $1 \mu\text{M}$ Endothelin 1, dem endogenen Agonisten von ET_B-Rezeptor, nahm die Emissionsratio ab, *Abbildung 7-4C*. Die Einzelkanal-Fluoreszenzen waren gegenläufig, *Abbildung 7-4C*. Die Reduktion der Emissionsratio ausgehend von der Basislinie wurde quantifiziert und betrug $3,1 \% \pm 0,3 \%$, *Abbildung 7-4D*.

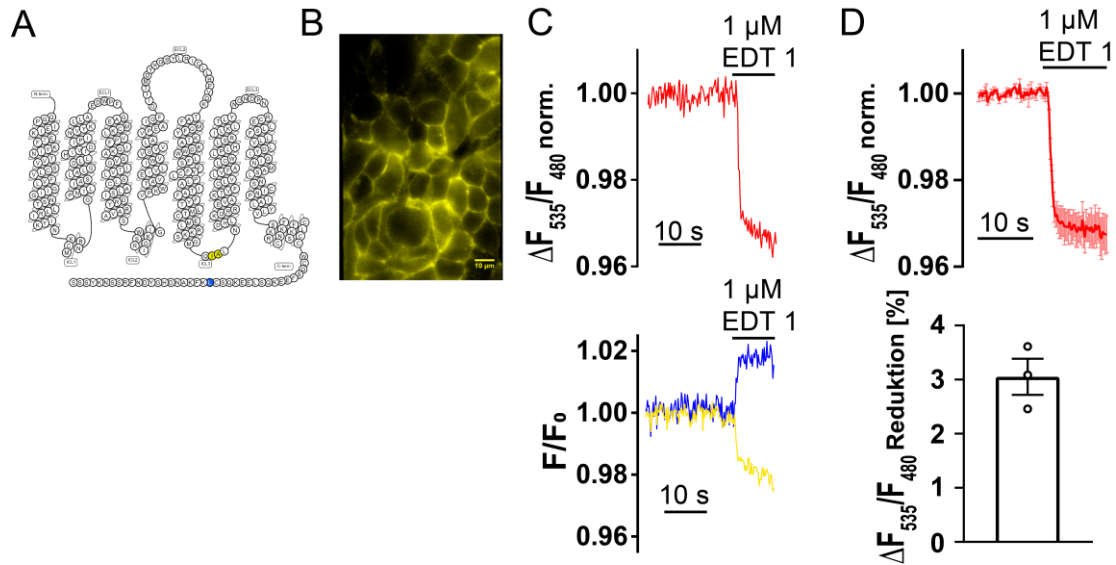


Abbildung 7-4 Klonierung eines ET_B -Rezeptor-Sensors (A) Ein Snakeplot des ET_B -Rezeptors wurde mit Hilfe von GPCRdb.org erstellt. Für die Klonierung eines FRET-basierten Konformations-Sensors wurde eYFP zwischen I309 und S310 (gelb) in ICL3 unterhalb von TM5 eingefügt. Der C-Terminus wurde nach L421 abgeschnitten, die Markierung mit mTurquoise2 erfolgte am verkürzten C-Terminus. (B) Zu sehen sind mikroskopische Bilder einer der ausgewählten Klone der HEK293-Zellen mit stabiler Expression des ET_B -Rezeptor-Sensors. (C) Die Emission von CFP und YFP einer Einzelzelle, die den ET_B -Rezeptor-Sensor transient exprimierte wurden aufgezeichnet. Es wurden 1 μ M Endothelin 1 (EDT 1) appliziert, das auftretende Photobleichen korrigiert und die Einzelkanal-Fluoreszenzen in den entsprechenden Farben dargestellt. Es handelt sich um eine repräsentative Messung (von $n = 3$). Die entsprechende Emissionsratio YFP / CFP ist rot dargestellt (auf Anfangswerte normiert). (D) Oben: Mittelwerte \pm SEM von Messungen zu den in (C) oben gezeigten ($n = 3$). (D) Unten: Prozentuale Änderung der Emissionsratio des ET_B -Rezeptor-Sensors ausgehend von der Basislinie ($3,1 \% \pm 0,3 \%$).

7.2 Diskussion

In dieser Studie wurde die Spannungsabhängigkeit der GPCRs am Beispiel der Prostanoid-Rezeptoren untersucht. Für Untersuchungen von Qualität und Quantität des Spannungseffektes auf die Rezeptor-Aktivität ist es von besonderer Bedeutung möglichst direkt die GPCR-Rezeptor-Aktivität zu messen.

Nach der erfolgreichen Klonierung des TP-Rezeptors, Abschnitt 5.1.1.1, der uns eine fundierte Untersuchung der Spannungsabhängigkeit des TP-Rezeptors ermöglichte, haben wir versucht unsere Herangehensweise zur Erstellung FRET-basierter Rezeptor-Sensoren zu systematisieren und für weitere Rezeptoren nutzbar zu machen.

GPCRs weisen aus zytosolischer Sicht eine Auswärtsbewegung der TM6 bei Aktivierung auf. Diese Tatsache kann genutzt werden, um FRET basierte Rezeptor-Sensoren zu erstellen, die diese Konformationsänderung und damit gegebenenfalls auch direkt die Änderungen der Rezeptoraktivität in Echtzeit sichtbar machen können (Villardaga *et al.*, 2003; Kauk and Hoffmann, 2018). Die klassische

Herangehensweise hierbei besteht darin, den C-Terminus mit einer CFP-Variante zu markieren und in die ICL3 eine YFP Variante einzufügen. Die genaue Position in der die Fluorophore zur Erstellung eines Rezeptor-Sensors inseriert werden, wird in der Regel für jeden Rezeptor individuell - durch ausprobieren - ermittelt. Wir haben den Versuch unternommen, die Positionierung der Fluorophore vom TP-Rezeptor-Sensor zu übernehmen. Hierbei wurde mTurquoise2 in den C-Terminus nach Möglichkeit nach Aminosäure 31, gezählt ausgehend vom Anfang der H8, eingefügt bzw. angehängt und der C-Terminus dahinter gekürzt. Das eYFP wurde möglichst nah an TM6 in ICL3 plaziert. Mit dieser Herangehensweise konnten in dieser Arbeit neben dem TP-Rezeptor-Sensor drei weitere, zuvor unpublizierte FRET-basierte GPCR-Rezeptor-Sensoren kloniert werden. Diese waren der IP-Rezeptor-Sensor, Abschnitt 7.1.1, der FP-Rezeptor-Sensor, Abschnitt 7.1.3 und der ET_B-Rezeptor-Sensor, Abschnitt 7.1.4, die für folgende Untersuchungen der Spannungsabhängigkeit von GPCRs genutzt werden können. Für die genannten Konstrukte konnten jeweils stabile HEK293-Zelllinien generiert werden, die für Messungen geeignete Expression und Membranlokalisation aufwiesen.

Alle diese Rezeptor-Sensoren zeigten bei Agonistgabe gegenläufige Einzelkanal-Fluoreszenzen. Die Änderung der YFP/CFP-Emissionsratio betrug ca. 2-3%. Es kam bei TP-Rezeptor-Sensor, IP-Rezeptor-Sensor und ET_B-Rezeptor-Sensor zu einer Zunahme der Emissionsratio, wohingegen es bei FP-Rezeptor-Sensor zu einer Abnahme der Emissionsratio kam. Ein „positives FRET“ bei GPCR-Konformations-Sensoren konnte auch bereits für einen M1ACh-Rezeptor-Sensor beobachtet werden, der analog zu unserem FP-Rezeptor-Sensor aufgebaut war (Jensen *et al.*, 2009), sowie für FIAsh-basierte M1ACh-, M3ACh- und M5ACh-Rezeptor-Sensoren (Ziegler *et al.*, 2011). Neben der bloßen Abstandsänderung der Fluorophore durch die Auswärtsbewegung von TM6 spielt auch die Änderung der Orientierung eine maßgebliche Rolle für die resultierende FRET Effizienz. Es ist daher nicht auf der Grundlage dieser Beobachtung davon auszugehen, dass der FP-Rezeptor sich im Mechanismus der Aktivierung von den anderen untersuchten Rezeptoren unterscheidet.

Für TP-Rezeptor-Sensor, IP-Rezeptor-Sensor und FP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve gemessen. Die Affinitäten der entwickelten Rezeptor-Sensoren waren mit den wt-Affinitäten vergleichbar, so dass eine weitere Nutzung erfolgen konnte. So lag der EC₅₀-Wert für den TP-Rezeptor-Sensor bei FRET-Einzelzellmessungen bei 95 nM U46619, *Abbildung 5-3C* unten und bei FRET-Messung in Mikrotiterplatten ergab sich ein EC₅₀-Wert von 48 nM U46619, *Abbildung 6-5A*. Die am TP-Rezeptor-Sensor gemessenen EC₅₀-Werte passen zu den EC₅₀-Werten, die in anderen Assays mit dem TP-Rezeptor mittels FRET bestimmt wurden. Sie ähnelten den Werten der TP-Rezeptors-GRK2-Interaktion mit 32 nM, *Abbildung 5-6D* und der Interaktion des TP-Rezeptors und Gα₁₃ mit 44 nM (Krett, 2015). In diesen Assays entspricht das beobachtete Signal der Fraktion an aktivierten Rezeptoren, weshalb sie mit dem TP-Rezeptor-Sensor Assay vergleichbar sind. In Radioliganden-Bindungs-Studien wurde ein K_D-Wert von 17 nM U46619 am TP-Rezeptor gemessen der zumindest

grob eine ähnliche Größenordnung aufwies (Abramovitz *et al.*, 2000). Der EC_{50} -Wert für IP-Rezeptor-Sensor bei FRET-Einzelzellmessungen lag mit 90 nM, *Abbildung 7-1D*, etwas höher, als der am IP-Rezeptor-wt in Radioliganden-Bindungs-Studien ermittelte K_D -Wert von 9,8 nM Iloprost (Abramovitz *et al.*, 2000). Für FP-Rezeptor-Sensor wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Der EC_{50} -Wert lag bei 249 nM, *Abbildung 7-3E*. Zum Vergleich: in Radioliganden-Verdrängungs-Studien wurde für U46619 ein nahezu identischer K_i -Wert von 241 nM U46619 am FP-Rezeptor gemessen (Abramovitz *et al.*, 2000).

Für den FP-Rezeptor gab es bereits eine Studie zu BRET-basierten Rezeptor-Sensoren (Sleno *et al.*, 2016). In dieser Studie erfolgte keine Bestimmung der EC_{50} -Werte. Interessanterweise war der FP-Rezeptor-Sensor mit der größten BRET Änderung in dieser Studie durch eine Insertion eines FLAsH Motivs, die die Bindung eines gelben Fluoreszenzfarbstoffs ermöglichte, zwischen Glutamin239 und Glycin240 generiert worden. Dies entspricht der in dieser Arbeit verwendeten Insertionsstelle. Im Gegensatz zur von uns beobachteten Erhöhung des FRET wurde eine Erniedrigung des BRET beobachtet. Diese lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass das Fluorophor in der ICL3 kein Protein und damit wesentlich kleiner war und der C-Terminus des Rezeptors nicht gekürzt wurde. Beides kann Einfluss auf die für die FRET-Effizienz wichtige Orientierung von mTurquoise2 gegenüber eYFP haben.

Zusammengenommen wurden in dieser Studie eine systematische und funktionierende Herangehensweise zur Generierung FRET-basierter GPCR-Rezeptor-Sensoren entwickelt und getestet, anhand der, neben dem TP-Rezeptor-Sensor, drei weitere, völlig neue FRET-basierte Rezeptor-Sensoren generiert werden konnten. Diese systematisierte Herangehensweise kann auch in folgenden Arbeiten angewandt werden. Einschränkend ist hinzuzufügen, dass die von uns für die Klonierung verwendeten GPCRs eine kurze ICL3 aufwiesen und eine längere ICL3 zur Klonierung von Rezeptor-Sensoren ggf. gekürzt werden müsste. Für zukünftige Messungen an TP-Rezeptor, IP-Rezeptor, FP-Rezeptor und ET_B -Rezeptor zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit stehen somit geeignete Rezeptor-Sensoren zur Verfügung. Neben den Erkenntnissen zur Spannungsabhängigkeit können diese generierten Rezeptor-Sensoren Einblicke in die Kinetik der Rezeptor-Aktivierung und Deaktivierung der entsprechenden Rezeptoren geben.

Literatur

- Abramovitz M, Adam M, Boie Y, Carrière MC, Denis D, Godbout C, Lamontagne S, Rochette C, Sawyer N, Tremblay NM, Belley M, Gallant M, Dufresne C, Gareau Y, Ruel R, Juteau H, Labelle M, Ouimet N, and Metters KM (2000) The utilization of recombinant prostanoid receptors to determine the affinities and selectivities of prostaglandins and related analogs. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1483**:285–293.
- Albarrán L, Dionisio N, López E, Salido GM, and Rosado JA (2013) The membrane potential modulates thrombin-stimulated Ca^{2+} mobilization and platelet aggregation. *Arch Biochem Biophys* **538**:130–137.
- Arcangeli A, Bianchi L, Becchetti A, Faravelli L, Coronello M, Mini E, Olivotto M, and Wanke E (1995) A novel inward-rectifying K^+ current with a cell-cycle dependence governs the resting potential of mammalian neuroblastoma cells. *J Physiol* **489**:455–471.
- Armstrong RA, Jonse RL, Peesapati V, Will SG, and Wilson NH (1985) Competitive antagonism at thromboxane receptors in human platelets. *Br J Pharmacol* **84**:595–607.
- Audet M, and Stevens RC (2019) Emerging structural biology of lipid G protein-coupled receptors. *Protein Sci* **28**:292–304.
- Audet M, White KL, Breton B, Zarzycka B, Han GW, Lu Y, Gati C, Batyuk A, Popov P, Velasquez J, Manahan D, Hu H, Weierstall U, Liu W, Shui W, Katritch V, Cherezov V, Hanson MA, and Stevens RC (2019) Crystal structure of misoprostol bound to the labor inducer prostaglandin E2 receptor. *Nat Chem Biol* **15**:11–17.
- Ayoub MA, Maurel D, Binet V, and Fink M (2007) Real-time analysis of agonist induced activation of protease-activated receptor 1/Gαi1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Mol Pharmacol* **71**:1329–1340.
- Bajar BT, Wang ES, Zhang S, Lin MZ, and Chu J (2016) A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors* **16**:1–24.
- Baker JG, Proudman RGW, and Hill SJ (2014) Identification of key residues in transmembrane 4 responsible for the secondary, low-affinity conformation of the human β1-adrenoceptor. *Mol Pharmacol* **85**:811–829.
- Ballesteros JA, and Weinstein H (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci* **25**:366–428.
- Barchad-Avitzur O, Priest MF, Dekel N, Bezanilla F, Parnas H, and Ben-Chaim Y (2016) A novel voltage sensor in the orthosteric binding site of the M2 muscarinic receptor. *Biophys J* **111**:1396–1408.
- Ben-Chaim Y, Chanda B, Dascal N, Bezanilla F, Parnas I, and Parnas H (2006) Movement of “gating charge” is coupled to ligand binding in a G-protein-coupled receptor. *Nature* **444**:106–109.
- Ben-Chaim Y, Tour O, Dascal N, Parnas I, and Parnas H (2003) The M2 muscarinic G-protein-coupled receptor is voltage-sensitive. *J Biol Chem* **278**:22482–22491.
- Berney C, and Danuser G (2003) FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophys J* **84**:3992–4010.
- Bertolino F, Valentin J -P, Maffre M, Grelac F, Bessac A -M, Maclouf J, Delhon A, Levy-Toledano S, Patoiseau J -F, Colpaert FC, and John GW (1995) Intrinsic activity of the non-prostanoid thromboxane A2 receptor antagonist, daltroban (BM 13,505), in human platelets in vitro and in the rat vasculature in vivo. *Br J Pharmacol* **115**:210–216.
- Bezanilla F (2008) How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:323–332.

- Bezanilla F (2000) The voltage sensor and the gate in ion channels. *Adv Protein Chem* **80**:555–591.
- Bilbrey GL, Herbin L, Carter NW, and Knochel JP (1973) Skeletal muscle resting membrane potential in potassium deficiency. *J Clin Invest* **52**:3011–3018.
- Birk A (2015) Voltage-dependence of adrenoceptor activity: Mechanisms and signal transduction Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Birk A, Rinne A, and Bünemann M (2015) Membrane potential controls the efficacy of catecholamine-induced β 1-Adrenoceptor activity. *J Biol Chem* **290**:27311–27320.
- Birnboim HC, and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513–1523.
- Bodmann EL, Krett AL, and Bünemann M (2017) Potentiation of receptor responses induced by prolonged binding of Gal3 and leukemia-associated RhoGEF. *FASEB J* **31**:3663–3676.
- Braman J, Papworthf C, and Greener A (1996) Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol bBology* **57**:31–44.
- Bünemann M, Frank M, and Lohse MJ (2003) Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:16077–16082.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SGF, Foon ST, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, and Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science (80-)* **318**:1258–1265.
- Chiang N, Kan WM, and Tai H-H (1996) Site-directed mutagenesis of cysteinyl and serine residues of human thromboxane A2 receptor in insect cells. *Arch Biochem Biophys* **334**:9–17.
- Chung CT, Niemela SL, and Miller RH (1989) One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172–2175.
- Coleman RA, Smith WL, and Narumiya S (1994) International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* **46**:205–229.
- Czerska M, Zieliński M, and Gromadzińska J (2016) Isoprostanes – A novel major group of oxidative stress markers. *Int J Occup Med Environ Health* **29**:179–190.
- D’Angelo DD, Eubank JJ, Davis MG, and Dorn GW (1996) Mutagenic analysis of platelet thromboxane receptor cysteines: Roles in ligand binding and receptor-effector coupling. *J Biol Chem* **271**:6233–6240.
- Dekel N, Priest MF, Parnas H, Parnas I, and Bezanilla F (2012) Depolarization induces a conformational change in the binding site region of the M2 muscarinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:285–290.
- Doležal V, and Tuček S (1999) Calcium channels involved in the inhibition of acetylcholine release by presynaptic muscarinic receptors in rat striatum. *Br J Pharmacol* **127**:1627–1632.
- Dror RO, Arlow DH, Maragakis P, Mildorf TJ, Pan AC, Xu H, Borhani DW, and Shaw DE (2011) Activation mechanism of the β 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:18684–18689.
- Fan H, Chen S, Yuan X, Han S, Zhang H, Xia W, Xu Y, Zhao Q, and Wu B (2019) Structural basis for ligand recognition of the human thromboxane A2 receptor. *Nat Chem Biol* **15**:27–33.
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* **6**:55–75.
- Frank M, Thümer L, Lohse MJ, and Bünemann M (2005) G protein activation without subunit dissociation depends on a Gai-specific region. *J Biol Chem* **280**:24584–24590.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, and Schiöth HB (2003) The g-protein-coupled receptors

- in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**:1256–1272.
- Freissmuth M, Offermanns S, and Böhm S (2016) *Pharmakologie und Toxikologie*, 2.Auflage.
- Friedhoff L, and Sonenberg M (1983) The membrane potential of human platelets. *Blood* **61**:180–185.
- Funk CD, Furci L, Moran N, and Fitzgerald G (1993) Point mutation in the seventh hydrophobic domain of the human thromboxane A2 receptor allows discrimination between agonist and antagonist binding sites. *Mol Pharmacol* **44**:934–939.
- Ganitkevich VA, and Isenberg G (1993) Membrane potential modulates inositol 1,4,5-triphosphate-mediated Ca²⁺ transients in guinea-pig coronary myocytes. *J Physiol* **470**:35–44.
- Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**:90–113.
- Glaaser IW, and Slesinger PA (2015) Structural insights into GIRK channel function. *Int Rev Neurobiol* **123**:117–160.
- Graf J, and Petersen OH (1978) Cell membrane potential and resistance in liver. *J Physiol* **284**:105–126.
- Gregory KJ, Sexton PM, and Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropsychopharmacol* **5**:157–167.
- Grisshammer R (2017) New approaches towards the understanding of integral membrane proteins: A structural perspective on G protein-coupled receptors. *Protein Sci* **26**:1493–1504.
- Grundmann M, Merten N, Malfacini D, Inoue Asuka, Preis P, Simon K, Rüttiger N, Ziegler N, Benkel T, Schmitt NK, Ishida S, Müller I, Reher R, Kawakami K, Inoue Ayumi, Rick U, Kühl T, Imhof D, Aoki J, König GM, Hoffmann C, Gomeza J, Wess J, and Kostenis E (2018) Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun* **9**:341.
- Gurevich V V., and Gurevich E V. (2019) The structural basis of the arrestin binding to GPCRs. *Mol Cell Endocrinol* **484**:34–41.
- Gurung IS, Martinez-Pinna J, and Mahaut-Smith MP (2008) Novel consequences of voltage-dependence to G-protein-coupled P2Y1 receptors. *Br J Pharmacol* **154**:882–9.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **391**:85–100.
- Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, and Gloriam DE (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* **16**:829–842.
- Hauser AS, Chavali S, Masuho I, Jahn LJ, Martemyanov KA, Gloriam DE, and Babu MM (2018) Pharmacogenomics of GPCR drug targets. *Cell* **172**:41-54.e19.
- Hayes JS, Lawler OA, Walsh MT, and Kinsella BT (1999) The prostacyclin receptor is isoprenylated. Isoprenylation is required for efficient receptor-effector coupling. *J Biol Chem* **274**:23707–23718.
- Hilger D, Masureel M, and Kobilka BK (2018) Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* **25**:4–12.
- Hillenbrand M, Schori C, Schöppe J, and Plückthun A (2015) Comprehensive analysis of heterotrimeric G-protein complex diversity and their interactions with GPCRs in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:E1181–E1190.
- Hirata T, and Narumiya S (2012) *Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity*, 1st ed.
- Hoffmann C, Nuber S, Zabel U, Ziegler N, Winkler C, Hein P, Berlot CH, Bu M, and Lohse MJ (2012) Comparison of the Activation Kinetics of the M3 Acetylcholine Receptor and a Constitutively Active Mutant Receptor in Living. 236–245.

- Hollenstein K (2019) Structures shed light on prostanoid signaling. *Nat Chem Biol* **15**:3–5.
- Hommers LG, Klenk C, Dees C, and Bünemann M (2010) G proteins in reverse mode: Receptor-mediated GTP release inhibits G protein and effector function. *J Biol Chem* **285**:8227–8233.
- Hoppe A (2017) Untersuchungen zur Regulation muskarinischer Rezeptoren durch das Membranpotential, Ruhr-Universität Bochum.
- Hoppe A, Marti-Solano M, Drabek M, Bünemann M, Kolb P, and Rinne A (2018) The allosteric site regulates the voltage sensitivity of muscarinic receptors. *Cell Signal* **42**:114–126.
- Hughes TE, Zhang H, Logothetis DE, and Berlot CH (2001) Visualization of a functional Gαq-green fluorescent protein fusion in living cells. *J Biol Chem* **276**:4227–4235.
- Jensen JB, Lyssand JS, Hague C, and Hille B (2009) Fluorescence changes reveal kinetic steps of muscarinic receptor-mediated modulation of phosphoinositides and Kv7.2/7.3 K⁺ channels. *J Gen Physiol* **133**:347–359.
- John GW, Colpaert FC, and Valentin JP (1998) Overview of the pharmacological properties of daltroban, a thromboxane A₂/prostanoid-receptor partial agonist. *Cardiovasc Drug Rev* **16**:264–287.
- Johnston CA, and Siderovski DP (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: Current structural insights. *Mol Pharmacol* **72**:219–230.
- Katritch V, Cherezov V, and Stevens RC (2013) Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**:531–556.
- Katritch V, Fenalti G, Abola EE, Roth BL, Cherezov V, and Stevens RC (2014) Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends Biochem Sci* **39**:233–244.
- Kauk M, and Hoffmann C (2018) Intramolecular and intermolecular FRET sensors for GPCRs – Monitoring conformational changes and beyond. *Trends Pharmacol Sci* **39**:123–135.
- Kaumann AJ, and Molenaar P (2008) The low-affinity site of the β₁-adrenoceptor and its relevance to cardiovascular pharmacology. *Pharmacol Ther* **118**:303–336.
- Kenakin TP (2006) *A Pharmacology Primer: Theory, Applications, and Methods*, 2. Auflage.
- Khasawneh FT, Huang JS, Turek JW, and Le Breton GC (2006) Differential mapping of the amino acids mediating agonist and antagonist coordination with the human thromboxane A₂ receptor protein. *J Biol Chem* **281**:26951–26965.
- Kim SO, Dozier BL, Kerry JA, and Duffy DM (2013) EP₃ receptor isoforms are differentially expressed in subpopulations of primate granulosa cells and couple to unique G-proteins. *Reproduction* **146**:625–635.
- Kovács T, Tordai A, Szász I, Sarkadi B, and Gárdos G (1990) Membrane depolarization inhibits thrombin-induced calcium influx and aggregation in human platelets. *FEBS Lett* **266**:171–174.
- Krasel C, and Hoffmann C (2010) Using Intramolecular Fluorescence Resonance Energy Transfer to Study Receptor Conformation, in *G Protein-Coupled Receptors: Essential Methods* pp 133–146.
- Krett A-L (2015) Investigation of the dynamics of thromboxane receptor-Gα₁₃-effector interactions by means of FRET, Philipps-Universität-Marburg.
- Krotz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, and Pohl U (2004) Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arter Thromb Vasc Biol* **24**:595–600.
- Kupchik YM, Barchad-Avitzur O, Wess J, Ben-Chaim Y, Parnas I, and Parnas H (2011) A novel fast mechanism for GPCR-mediated signal transduction--control of neurotransmitter release. *J Cell Biol* **192**:137–151.

- Lancaster MK, Dibb KM, Quinn CC, Leach R, Lee JK, Findlay JBC, and Boyett MR (2000) Residues and mechanisms for slow activation and Ba²⁺ block of the cardiac muscarinic K⁺ channel, Kir3.1/Kir3.4. *J Biol Chem* **275**:35831–35839.
- Latorraca NR, Venkatakrisnan AJ, and Dror RO (2017) GPCR dynamics: Structures in motion. *Chem Rev* **117**:139–155.
- Lohse MJ, Nuber S, and Hoffmann C (2012) Fluorescence / bioluminescence resonance energy transfer techniques to study g-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacol Rev* **64**:299–336.
- Luttrell LM, Wang J, Plouffe B, Smith JS, Yamani L, Kaur S, Jean-Charles PY, Gauthier C, Lee MH, Pani B, Kim J, Ahn S, Rajagopal S, Reiter E, Bouvier M, Shenoy SK, Laporte SA, Rockman HA, and Lefkowitz RJ (2018) Manifold roles of β -arrestins in GPCR signaling elucidated with siRNA and CRISPR/Cas9. *Sci Signal* **11**.
- Mahaut-Smith MP (2012) The unique contribution of ion channels to platelet and megakaryocyte function. *J Thromb Haemost* **10**:1722–1732.
- Mahaut-Smith MP, Hussain JF, and Mason MJ (1999) Depolarization-evoked Ca²⁺ release in a non-excitable cell, the rat megakaryocyte. *J Physiol* **515**:385–390.
- Manglik A, and Kruse AC (2017) Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry* **56**:5628–5634.
- Marret H, Simon E, Beucher G, Dreyfus M, Gaudineau A, Vayssière C, Lesavre M, Pluchon M, Winer N, Fernandez H, Aubert J, Bejan-Angoulvant T, Jonville-Bera AP, Clouqueur E, Houfflin-Debarge V, Garrigue A, and Pierre F (2015) Overview and expert assessment of off-label use of misoprostol in obstetrics and gynaecology: Review and report by the Collège national des gynécologues obstétriciens français. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **187**:80–84.
- Martinez-Pinna J, Gurung IS, Mahaut-smith MP, and Morales A (2010) Direct voltage control of endogenous lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptors in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* **10**:1683–1693.
- Martinez-Pinna J, Gurung IS, Vial C, Leon C, Gachet C, Evans RJ, and Mahaut-Smith MP (2005) Direct voltage control of signaling via P2Y1 and other G α_q -coupled receptors. *J Biol Chem* **280**:1490–1498.
- Martinez-Pinna J, Tolhurst G, Gurung IS, Vandenberg JI, and Mahaut-Smith MP (2004) Sensitivity limits for voltage control of P2Y receptor-evoked Ca²⁺ mobilization in the rat megakaryocyte. *J Physiol* **555**:61–70.
- Mason MJ, and Mahaut-Smith MP (2001) Voltage-dependent Ca²⁺ release in rat megakaryocytes requires functional IP3 receptors. *J Physiol* **533**:175–183.
- Mastop M, Reinhard NR, Zuconelli CR, Terwey F, Gadella TWJ, Van Unen J, Adjobo-Hermans MJW, and Goedhart J (2018) A FRET-based biosensor for measuring G α_{13} activation in single cells. *PLoS One* **13**:1–19.
- McCoy KL, Traynelis SF, and Hepler JR (2010) PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology. *Mol Pharmacol* **77**:1005–1015.
- Miki I, Kase H, and Ishii A (1992) Differences in activities of thromboxane A2 receptor agonists in smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **227**:199–204.
- Milligan G, and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br J Pharmacol* **147**:S46–S55.
- Milne GL, Dai Q, and Roberts LJ (2014) The isoprostanes-25 years later. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* **1851**:433–445.

- Miyawaki A (2011) Proteins on the move: Insights gained from fluorescent protein technologies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**:656–668.
- Mizuno N, and Itoh H (2009) Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *NeuroSignals* **17**:42–54.
- Moore CAC, Milano SK, and Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**:451–482.
- Moreno-Galindo EG, Alamilla J, Sanchez-Chapula JA, Tristani-Firouzi M, and Navarro-Polanco RA (2016) The agonist-specific voltage dependence of M2 muscarinic receptors modulates the deactivation of the acetylcholine-gated K⁺ current (I K_{ACh}). *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **468**:1207–1214.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Jackson L, and Ii R (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9383–9387.
- Nakahata N (2008) Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* **118**:18–35.
- Narumiya S, Sugimoto Y, and Ushikubi F (1999) Prostanoid Receptors : Structures, Properties, and Functions. *Physiol Rev* **79**:1193–1226.
- Navarro-Polanco RA, Aréchiga-Figueroa IA, Salazar-Fajardo PD, Benavides-Haro DE, Rodríguez-Elías JC, Sachse FB, Tristani-Firouzi M, Sánchez-Chapula JA, and Moreno-Galindo EG (2013) Voltage sensitivity of M2 muscarinic receptors underlies the delayed rectifier-like activation of ACh-gated K⁺ current by choline in feline atrial myocytes. *J Physiol* **591**:4273–4286.
- Navarro-Polanco RA, Moreno Galindo EG, Ferrer-Villada T, Arias M, Rigby JR, Sánchez-Chapula JA, and Tristani-Firouzi M (2011) Conformational changes in the M2 muscarinic receptor induced by membrane voltage and agonist binding. *J Physiol* **589**:1741–1753.
- Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, and Samuelsson B (1976) Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* **261**:558–560.
- Nelson JR, and Raskin S (2019) The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease. *Postgrad Med* **131**:268–277.
- Nikolaev VO, Bünnemann M, Hein L, Hannawacker A, and Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**:37215–37218.
- O’Hayre M, Degese MS, and Gutkind JS (2014) Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **126**–135.
- Oesterling TO, Morozowich W, and Roseman TJ (1972) Prostaglandins. *J Pharm Sci* **61**:1861–1895.
- Ohana L, Barchad O, Parnas I, and Parnas H (2006) The metabotropic glutamate G-protein-coupled receptors mGluR3 and mGluR1a are voltage-sensitive. *J Biol Chem* **281**:24204–24215.
- Oldham WM, and Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:60–71.
- Pak MD, and Fishman PH (1996) Anomalous behaviour of cgp 12177a on β 1-adrenergic receptors. *J Recept signal Transduct Res* **16**:1–23.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science (80-)* **289**:739.
- Pales J, Lopez A, and Gual A (1988) Platelet membrane potential as a modulator of aggregating mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **944**:85–89.

- Pannunzio A, and Coluccia M (2018) Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 inhibitors in cancer: a review of oncology and medicinal chemistry literature. *Pharmaceuticals* **11**:162–181.
- Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Hölte HD, and Mohr K (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: Complex role of the conserved tryptophan M242Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* **70**:181–193.
- Rasmussen SGF, Choi HJ, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, Devree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS, Schnapp A, Konetzki I, Sunahara RK, Gellman SH, Pautsch A, Steyaert J, Weis WI, and Kobilka BK (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature* **469**:175–181.
- Rasmussen SGF, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VRP, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GFX, Weis WI, and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human β_2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383–387.
- Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, and Kobilka BK (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**:549–55.
- Rinne A, Birk A, and Bünemann M (2013) Voltage regulates adrenergic receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:1536–1541.
- Rinne A, Mobarec JC, Mahaut-Smith M, Kolb P, and Bünemann M (2015) The mode of agonist binding to a G protein-coupled receptor switches the effect that voltage changes have on signaling. *Sci Signal* **8**:1–8.
- Sahlholm K, Barchad-Avitzur O, Marcellino D, Gómez-Soler M, Fuxe K, Ciruela F, and Århem P (2011) Agonist-specific voltage sensitivity at the dopamine D2S receptor - Molecular determinants and relevance to therapeutic ligands. *Neuropharmacology* **61**:937–949.
- Sahlholm K, Marcellino D, Nilsson J, Fuxe K, and Århem P (2008a) Differential voltage-sensitivity of D2-like dopamine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **374**:496–501.
- Sahlholm K, Marcellino D, Nilsson J, Fuxe K, and Århem P (2008b) Voltage-sensitivity at the human dopamine D2S receptor is agonist-specific. *Biochem Biophys Res Commun* **377**:1216–1221.
- Sahlholm K, Nilsson J, and Marcellino D (2008) Voltage-Dependence of the Human Dopamine D2 Receptor. *Synapse* **62**:476–480.
- Sahlholm K, Nilsson J, Marcellino D, Fuxe K, and Århem P (2012) Voltage sensitivities and deactivation kinetics of histamine H3 and H4 receptors. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* **1818**:3081–3089.
- Semenov I, and Brenner R (2018) Voltage effects on muscarinic acetylcholine receptor-mediated contractions of airway smooth muscle. *Physiol Rep* **6**:1–11.
- Shonberg J, Kling RC, Gmeiner P, and Löber S (2015) GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorganic Med Chem* **23**:3880–3906.
- Simmons DL, Botting RM, and Hla T (2004) Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**:387–437.
- Simon MI, Strathmann MP, and Gautam N (1991) Diversity of g proteins. *Science* **252**:802–808.
- Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, and Holst B (2013) Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - Opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol* **170**:1349–1362.
- Sleno R, Pétrin D, Devost D, Goupil E, Zhang A, and Hébert TE (2016) Designing BRET-based conformational biosensors for G protein-coupled receptors. *Methods* **92**:11–18.

- Slutsky I, Parnas H, and Parnas I (1999) Presynaptic effects of muscarine on ACh release at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* **514**:769–782.
- Spiegel AM, Backlund Jr PS, Butrynski JE, Jones TLZ, and Simonds WF (1991) The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci* **16**:338–341.
- Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, and Roth H (2010) *Medizinische Chemie*, 2.Auflage.
- Stitham J, Stojanovic A, Merenick BL, O'Hara KA, and Hwa J (2003) The unique ligand-binding pocket for the human prostacyclin receptor: Site-directed mutagenesis and molecular modeling. *J Biol Chem* **278**:4250–4257.
- Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, and Narumiya S (1992) Cloning and expression of cDNA for a mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype. *J Biol Chem* **267**:6463–6466.
- Suzuki N, Hajicek N, and Kozasa T (2009) Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *NeuroSignals* **17**:55–70.
- Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, and Huang X-Y (2016) Regulation, signaling and physiological functions of G-proteins. *J Mol Biol* **428**:3850–3868.
- Tai H-H, Huang C, and Chiang N (1997) Structure and function of prostanoid receptors as revealed by site-directed mutagenesis. *Adv Exp Med Biol* **407**:205–209.
- Tateyama M, and Kubo Y (2013) Binding of Gq protein stabilizes the activated state of the muscarinic receptor type 1. *Neuropharmacology* **65**:173–181.
- Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, Horita S, Yamashita K, Hirata K, Sekiguchi Y, Yasuda S, Shiroishi M, Shimizu T, Urushibata Y, Kajiwaraya Y, Inazumi T, Hotta Y, Asada H, Nakane T, Shiimura Y, Nakagita T, Tsuge K, Yoshida S, Kuribara T, Hosoya T, Sugimoto Y, Nomura N, Sato M, Hirokawa T, Kinoshita M, Murata T, Takayama K, Yamamoto M, Narumiya S, Iwata S, and Kobayashi T (2019) Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP4 at the lipid-bilayer interface. *Nat Chem Biol* **15**:18–26.
- Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, and Filipek S (2012) Action of molecular switches in GPCRs - theoretical and experimental studies. *Curr Med Chem* **19**:1090–1109.
- Turek JW, Halmos T, Sullivan NL, Antonakis K, and Le Breton GC (2002) Mapping of a ligand-binding site for the human thromboxane A2 receptor protein. *J Biol Chem* **277**:16791–16797.
- Ungrin MD, Carrière MC, Denis D, Lamontagne S, Sawyer N, Stocco R, Tremblay N, Metters KM, and Abramovitz M (2001) Key structural features of prostaglandin E2 and prostanoid analogs involved in binding and activation of the human EP1 prostanoid receptor. *Mol Pharmacol* **59**:1446–1456.
- Valentin FBJ, Rieu JPJ, Colpaert FC, and John GW (1997) Evidence for partial agonist properties of daltroban (BM13,505) at TP receptors in the anaesthetized open-chest rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **356**:462–466.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Heydenreich FM, Flock T, Miljus T, Balaji S, Bouvier M, Veprintsev DB, Tate CG, Schertler GFX, and Babu MM (2016) Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature* **536**:484–487, Nature Publishing Group.
- Vickery Owen N., Machtens J-P, Tamburrino G, Seeliger D, and Zachariae U (2016) Structural mechanisms of voltage sensing in g protein-coupled receptors. *Structure* **24**:1–11.
- Vickery Owen N, Machtens J-P, and Zachariae U (2016) Membrane potentials regulating GPCRs: insights from experiments and molecular dynamics simulations. *Curr Opin Pharmacol* **30**:44–50.
- Vilardaga J-P, Bünemann M, Feinstein TN, Lambert N, Nikolaev VO, Engelhardt S, Lohse MJ, and Hoffmann C (2009) GPCR and g proteins: drug efficacy and activation in live cells. *Mol*

- Endocrinol* **23**:590–599.
- Vilardaga J-P, Bünemann M, Krasel C, Castro M, and Lohse MJ (2003) Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol* **21**:807–812.
- Vogelstein B, and Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:615–619.
- Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E, McCorvy JD, Jiang Y, Chu M, Siu FY, Liu W, Xu HE, Cherezov V, Roth BL, and Stevens RC (2013) Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science* (80-) **340**:615–619.
- Wall MA, Posner BA, and Sprang SR (1998) Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure* **6**:1169–1183.
- Wang L, Yao D, Deepak RNVK, Liu H, Xiao Q, Fan H, Gong W, Wei Z, and Zhang C (2018) Structures of the human PGD2 receptor CRTH2 reveal novel mechanisms for ligand recognition. *Mol Cell* 1–12.
- Weis WI, and Kobilka BK (2018) The molecular basis of g protein-coupled receptor activation. *Annu Rev Biochem* **87**:897–919.
- Whittle BJ, Silverstein AM, Mottola DM, and Clapp LH (2012) Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil is a potent DP 1 and EP 2 agonist. *Biochem Pharmacol* **84**:68–75.
- Wingler LM, Elgeti M, Hilger D, Latorraca NR, Lerch MT, Staus DP, Dror RO, Kobilka BK, Hubbell WL, and Lefkowitz RJ (2019) Angiotensin analogs with divergent bias stabilize distinct receptor conformations. *Cell* **176**:468-478.e11.
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E, and Lohse MJ (1996) adrenergic receptor kinase by protein kinase C. **93**:2105–2109.
- Wolters V, Krasel C, Brockmann J, and Bünemann M (2015) Influence of Gαq on the dynamics of M3-acetylcholine receptor-G-protein-coupled receptor kinase 2 interaction. *Mol Pharmacol* **8**:9–17.
- Woodward DF, Jones RL, and Narumiya S (2011) International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* **63**:471–538.
- Yair B, Broide C, and Parnas H (2019) The coupling of the M2 muscarinic receptor to its G protein is voltage dependent. *PLoS One* **14**:1–11.
- Yang M, and Brackenbury WJ (2013) Membrane potential and cancer progression. *Front Physiol* **4**:1–10.
- Ziegler N, Bätz J, Zabel U, Lohse MJ, and Hoffmann C (2011) FRET-based sensors for the human M1-, M3-, and M5-acetylcholine receptors. *Bioorganic Med Chem* **19**:1048–1054.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Pharmakologie und Spannungsabhängigkeit ausgewählter Prostanoid-Rezeptoren“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 12.02.2020

.....
(Michael Kurz)

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Publizierte Artikel

Kurz M, Krett A-L, Bünemann M (2020). Voltage dependence of prostanoid receptors. *Molecular Pharmacology*, doi: 10.1124/mol.119.118372. [Epub ahead of print]

Carvalho J, Chennupati R, Li R, Günther S, Kaur H, Zhao W, Tonack S, **Kurz M**, Mößlein N, Bünemann M, Offermanns S, and Wettschureck N (2020). Orphan G-Protein-Coupled Receptor GPRC5B Controls Smooth Muscle Contractility and Differentiation by Inhibiting Prostacyclin Receptor Signaling. *Circulation*, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043703. [Epub ahead of print]

Publizierte *Abstracts*

Kurz M, Krett A, Bünemann M (2019). Voltage dependence of prostanoid receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392: S12

Kurz M, Krett A, Bünemann M (2018). Voltage dependence of the thromboxane receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391: S67

Konferenzbeiträge

02/2019

Vortrag

“Voltage dependence of Prostanoid Receptors” German Pharm-Tox Summit 2019, Stuttgart (Germany)

02/2019

Poster Präsentation

“Voltage dependence of Prostanoid Receptors” Gordon Research Conference: 'How Form, Function, Content and Context Shape GPCR Signaling, Ventura (USA)

04/2018

Poster Präsentation

“Thromboxane-receptor activation shows voltage dependence” 7th Focused Meeting on Cell Signalling, Nottingham (GB)

02/2018

Poster Präsentation

“Voltage dependence of the Thromboxane Receptor” German Pharm-Tox Summit 2018, Göttingen (Germany)

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Prof. Bünemann** für die Möglichkeit in seiner Gruppe zu promovieren und mit *Patch-Clamp* und FRET gleich zwei interessante Methoden zu erlernen. Weiterhin möchte ich mich für die gute Atmosphäre, die gute Betreuung, die immer offene Tür und die wirklich große Freiheit auch eigene Ideen einzubringen und umzusetzen bedanken. Besonders positiv sind mir die Konferenzen in Erinnerung geblieben, bei denen ich meine Ergebnisse vorstellen durfte und die auch meine Motivation gestärkt haben.

Danke an die Gutachter Herrn **Prof Kockskämper** und natürlich Herrn **Prof. Bünemann** für Ihr Mitwirken an meiner Promotion und die Bereitschaft die Gutachtertätigkeit zu übernehmen. Weiterhin Danke ich Herrn **Prof. Li** und Herrn **Prof. Kolb** dafür, dass Sie sich bereit erklärt haben Teil der Prüfungskommission zu sein.

Ebenfalls ein besonderer Dank gilt dir **Claudia** dafür, dass du immer hinter mir stehst, an mich glaubst und mich aufbaust, wenn ich ein Tief habe. Danke liebe **Mama** und liebe **Oma** für die Unterstützung und den Zuspruch während und vor der Promotion. Ich weiß, dass ich mich auf euch verlassen kann.

Danke **Cornelius** für die Unterstützung in all den wissenschaftlichen und nicht wissenschaftlichen Fragen und die vielen guten Gespräche. Du hast mir wirklich sehr geholfen! Vielen Dank für die coole Zeit in den USA inklusive Road Trip, Nationalparks und dem guten Tex-Mex Essen.

Danke **Alex** und Danke **Julia** für das geduldige Einführen in die Patch-Clamp Technik. Danke **Anna** für die Einführung in die Zellkulturarbeit und dafür, dass du dein Wissen zu den TP-Rezeptor-Assays mit mir geteilt hast.

Ich habe mich besonders über das Zustandekommen des Daltroban Projektes gefreut. Danke an Herrn Bünemann für die Freiheit, auch etwas abseits meines ursprünglichen Projektes zu forschen. Ich möchte allen Danken, die an diesem Projekt mitarbeiten. Danke **Prof. Horst Lemoine** für Ihre hochauflösenden Messungen, die uns wichtige Einblicke geben. Danke **Lukas** für deine Synthesen und deine Initiative. Danke an **Prof. Peter Kolb** und **Victor** für die MD-Simulationen. Ich hoffe, dass wir durch eure Arbeit weitere interessante Erkenntnisse gewinnen werden, die uns helfen den zugrundeliegenden Mechanismus aufzudecken. Danke an **Olga** für die Messungen am Nikon.

Danke an **Prof. Jens Kockskämper** für die Möglichkeit meine Untersuchungen zum TP-Rezeptor an Herzzellen durchführen zu können. Danke **Hauke** für die praktische Unterstützung im Labor.

Danke **Volker** für die Hilfe bei all den Computerproblemen.

Danke **Nadja** für die Hilfe am Konfokalmikroskop und die Unterstützung bei allen Fragen rund um Illustrator.

Danke an alle Wahlpflichtpraktikanten, sowie an alle meine 6-Wochen Praktikanten.

Vielen Dank an die Mensa-Gänger für die schönen gemeinsamen Stunden. Und vielen Dank an die Mitarbeiter der Mensa für das gute Essen, auch wenn sie diesen Text wahrscheinlich nie lesen werden. Danke an Bernd für den guten Krautsalat, der mich durch die Jahre begleitet hat.

Danksagung

Danke an **das ganze Institut** für die schöne Zeit, die vielen guten Gespräche und die gute Atmosphäre. Die Wanderung, Kanufahrt und der Ausflug mit den Alpakas und vieles mehr. Danke auch dafür, dass sich zur Arbeit gehen oft nicht danach angefühlt hat.

Danke für das Korrekturlesen des Papers bzw. der Doktorarbeit an **Claudia, Anna, Alex, Sina, Julia** und **Oli**.

Vielen Dank an alle, die mir in meiner Freizeit Ausgleich und Erholung ermöglicht haben. Danke an die Skatrunde und die Freunde zu Hause.

Lebenslauf

Zum Schutz personenbezogener Daten steht der Lebenslauf in der Online-Version nicht zur Verfügung.